

PÁL-GÁBOR HENRIETTA

**A lizofoszfatidsav szerepe
a β_2 -mikroglobulin amiloidképzésében**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Témavezetők:

DR. KARDOS JÓZSEF

adjunktus

ELTE TTK Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék

DR. LILIOM KÁROLY

tudományos főmunkatárs

MTA Enzimológiai Intézet

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar

Biológia Doktori Iskola

Iskolavezető: DR. ERDEI ANNA

Szerkezeti Biokémia Doktori Program

Programvezető: DR. GRÁF LÁSZLÓ

Budapest, 2011

Tartalomjegyzék

Bevezetés	1
1. Irodalmi áttekintés	3
1.1. A fehérjék kóros aggregációja	3
1.2. A vesedialízishez kötött amiloidózis	7
1.3. Lipid-fehérje kölcsönhatások szerepe az amiloidképződésben	10
1.4. A lizofoszfatidsav	10
2. Célkitűzések	13
3. Anyagok és módszerek	15
3.1. Klónozás és irányított mutagenézis	15
3.2. A fehérjék előállítása	15
3.3. A fehérjék renaturálása	15
3.4. A fehérjék tisztítása	16
3.5. A β 2m polimerizációjának vizsgálata	16
3.5.1. β 2m amiloidszálak előállítása alacsony pH-n	16
3.5.2. A β 2m polimerizációjának vizsgálata különböző lipidek jelenlétében	17
3.5.3. A β 2m polimerizációjának vizsgálata LPA jelenlétében	17
3.6. Fluoreszcencia spektroszkópia	17
3.6.1. Thioflavin T (ThT) fluoreszcencia	17
3.6.2. 8-anilínonaphtalene-1-sulfonic acid (ANS) fluoreszcencia	18
3.7. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia	18
3.8. Transzmissziós elektronmikroszkópia	18
3.9. Differenciális pásztázó kalorimetria	18
3.10. Izotermális titrációs kalorimetria (ITC)	19
3.10.1. Az LPA kritikus micella koncentrációjának meghatározása	19
3.10.2. A β 2m – LPA kölcsönhatás vizsgálata	19
3.11. Limitált proteolízis	19
3.12. Az amiloidszálak stabilitásának vizsgálata hőkezeléssel	20
3.13. Szálak stabilitásának vizsgálata pH 7,4-n	20
3.14. Kémiai keresztkötés	20
3.15. FTIR spektroszkópia	21
3.16. Dokkolási számítások	21

3.17. Elektrosztatikai számítások	21
3.18. Statisztikai analízis	22
4. Eredmények és értékelésük	23
4.1. A β 2m–LPA kölcsönhatás jellemzése	23
4.1.1. A β 2m amiloidképzésének vizsgálata különböző lipidek jelenlétében	23
4.1.2. Az amiloidszálak vizsgálata transzmissziós elektronmikroszkóppal	25
4.1.3. A β 2m amiloidképzésének függése az LPA koncentrációjától	25
4.1.4. A β 2m–LPA kölcsönhatás vizsgálata CD spektroszkópiával	26
4.1.5. A β 2m amiloidszálak vizsgálata CD spektroszkópiával	27
4.1.6. A β 2m–LPA kölcsönhatás vizsgálata ANS fluoreszcenciával	30
4.1.7. A β 2m–LPA kölcsönhatás vizsgálata differenciális pásztázó kalorimetriával	31
4.1.8. A monomer β 2m konformációjának hatása az amiloidképződésre	32
4.1.9. Limitált proteolízis	33
4.1.10. Az LPA kritikus micella koncentrációjának meghatározása ITC-vel	35
4.1.11. A β 2m–LPA kölcsönhatás vizsgálata ITC-vel	36
4.1.12. Kémiai keresztkötés	37
4.1.13. Az LPA hatása a β 2m amiloidszálak stabilitására	39
4.1.14. Az eredmények értékelése	39
4.2. Az LPA és az SDS fontosabb kötőhelyei a β 2m felszínén	45
4.2.1. A potenciális kötőhelyek meghatározása <i>in silico</i> dokkolással	45
4.2.2. Irányított mutagenézis	46
4.2.3. A β 2m variánsok amiloidképzésének vizsgálata ThT fluoreszcenciával	46
4.2.4. A β 2m variánsok szerkezeti változásainak vizsgálata CD spektroszkópiával	49
4.2.5. Az eredmények értékelése	52
4.3. Az alacsony pH-n és az LPA jelenlétében növesztett amiloidszálak összehasonlítása	55
4.3.1. A szálak morfológiájának vizsgálata transzmissziós elektronmikroszkóppal	55
4.3.2. A szálak stabilitásának vizsgálata ThT fluoreszcenciával	55
4.3.3. A szálak szerkezetének vizsgálata FTIR spektroszkópiával	58
4.3.4. Az eredmények értékelése	59

4.4. A kísérletek élettani relevanciája	62
Összefoglalás	65
Summary	67
Ábrák jegyzéke	69
Táblázatok jegyzéke	71
Rövidítések jegyzéke	73
Köszönetnyilvánítás	75
Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények	77
Irodalomjegyzék	79

Bevezetés

A fehérjék kóros aggregációja több mint 20 humán betegségben játszik szerepet, ilyen például az Alzheimer-, a Parkinson- vagy a Huntington-kór. Ezeknél a betegségeknel az egyébként oldható fehérjék oldhatatlan szálakká aggregálódnak, melyek rendezett béta-lemezes szerkezettel rendelkeznek, ezeket nevezzük amiloidszálaknak. Az aggregátumok lerakódnak a központi idegrendszerben vagy a perifériás szövetekben, és különféle súlyos tüneteket okoznak.

A vesedialízishez kötött amiloidózis (*dialysis-related amyloidosis*, DRA) a β_2 -mikroglobulin (β_2m) aggregációja miatt kialakuló betegség. A β_2m egy minden magvas humán sejt felszínén jelen lévő immunfehérje, a fő hisztokompatibilitási komplex-I (MHC-I) egyik alegysége. A komplex disszociációja után a fehérje a vérbe kerül, majd a vesében lebomlik. A hosszú ideig vesedialízisben részesülő betegek véréből a β_2m nem tud kiválasztódni, és koncentrációja az egészséges érték sokszorosára nő. Több éves kezelés után a β_2m amiloid formájában lerakódik az ízületekben és az izmokban, súlyos mozgásszervi problémákat okozva.

Mindmáig nem tisztázott, pontosan milyen tényezők játszanak szerepet a β_2m amiloidképzésében fiziológiás körülmények között. A fehérje alacsony pH-n spontán képes amiloidszálakká aggregálódni *in vitro*. Semleges pH-n azonban ez akkor sem következik be, ha a fehérje koncentrációja többszöröse a DRA-s betegekben mért értékeknek. Mivel a megemelkedett fehérjekoncentráció önmagában nem elég az amiloidképződéshez, feltételezhető, hogy egyéb, a szervezetben jelen lévő molekuláknak is szerepe van a folyamatban. Az elmúlt években számos vegyületről mutatták ki, hogy képes kiváltani a β_2m amiloidképzését semleges pH-n *in vitro*, ilyen például a réz, a kollagén, a heparin vagy a trifluoroetanol. Ezek közül néhány jelen van az élő szervezetben és ténylegesen szerepe lehet a DRA kialakulásában, míg mások fontos modellvegyületeknek tekinthetők.

2004-ben Yamamoto és munkatársai kimutatták, hogy az SDS képes semleges pH-n, a már felnőtt szálak szonikálásával kapott magok jelenlétében indukálni a β_2m amiloidképzését. Ez felvetette az SDS-hez hasonló felépítésű, az élő szervezetben előforduló lizofoszfolipidek esetleges szerepét a fehérje polimerizációjában. 2006 tavaszán kutatócsoportunk felfedezte, hogy a lizofoszfatidsav (LPA), egy – a vérben jelen lévő – lizofoszfolipid mediátor képes kiváltani a β_2m amiloidképzését fiziológiás körülmények között, magok jelenlétében *in vitro*. Ebbe a kutatásba bekapcsolódva célom a β_2m –LPA kölcsönhatás részleteinek felderítése volt, ennek a munkának az eredményei képezik doktori dolgozatom anyagát.

Irodalmi áttekintés

1.1. A fehérjék kóros aggregációja

Az amiloidózisok első ismert említése az irodalomban 1639-ből, Nicolaus Fontanustól származik, aki egy páciense lépében fedezett fel abnormális lerakódásokat. A 17–19. századból több esettanulmányt ismerünk, amelyek nagy valószínűséggel valamilyen amiloidképződéssel járó betegséget írtak le, ezekben zsír-, viasz- vagy kocsonyaszerű anyagként jellemezték a különböző szervekben talált lerakódásokat. Az amiloid elnevezést Rudolf Virchow vezette be 1854-ben. A német orvos-patológus az egyik elhunyt beteg agyszövetében talált a fentiekhez hasonló képződményeket, amelyeket festődésük alapján keményítőtartalmú szemcséknek vélt, ezért a latin *amylum*, illetve görög *amylon* szavak után amiloidnak nevezte el őket. 1859-ben Nikolaus Friedreich német orvos és August Kekulé német szerves kémikus kimutatták, hogy a lerakódások nem szénhidrát, hanem fehérje természetűek, ennek ellenére továbbra is fennmaradt a Virchow által bevezetett terminológia (Sipe & Cohen, 2000; Kyle, 2001).

A festési eljárások és mikroszkópos technikák fejlődésével az amiloid egyre több tulajdonságára derült fény. 1922-ben Hermann Bannhold felfedezte, hogy a lerakódások kongóvörös festékekkel specifikusan festődnek (Bannhold, 1922). 1927-ben Paul Divry és Marcel Florkin kimutatta, hogy az ilyen módon megfestett minták polarizált fényben vizsgálva jellegzetes zöld kettőtörést mutatnak (Divry & Florkin, 1927). Ez arra utalt, hogy az addig amorfnak gondolt amiloid rendezett belső szerkezettel rendelkezik. 1959-ben Alan Cohen és Evan Calkins elektronmikroszkópos vizsgálatokkal igazolta, hogy a különböző eredetű amiloid lerakódások mindegyike jellegzetes szálak felépítésű (Cohen & Calkins, 1959). Még részletesebb kutatások során az is kiderült, hogy az amiloidszálak vékonyabb, tipikusan kb. 2–6 nm átmérőjű protofilamentumok egymás köré csavarodásával jönnek létre. Röntgendiffrakációs vizsgálatok kimutatták, hogy az egyes protofilamentumokban a polipeptidlánc jellegzetes kereszt- β -lemezes szerkezettel rendelkezik, amelyben a β -redők merőlegesek a szálak hossz tengelyére (Eanes & Glenner, 1968; Bonar *et al.*, 1969; Sunde & Blake, 1997).

Mára több mint 20 betegséget írtak le, amelyek valamilyen módon az amiloidképződéssel hozhatók kapcsolatba. Ezek közös jellemzője, hogy kialakulásuk során valamilyen, egyébként oldható fehérje oldhatatlan szálakká aggregálódik. Nagyon sokfélék lehetnek viszont abból a szempontból, hogy a milyen szövetekben történik az aggregáció, a kialakult amiloidszálak mely szervekben rakódnak le, és ez végül milyen tünetekhez vezet. Bizonyos fehérjék a sejtek belsejében, a citoplazmában aggregálódnak, míg más esetekben az aggregátumok extracellulárisan, a sejtek felszínén jelennek meg. Az aggregáció bekövetkezhet a központi idegrendszerben, a neuronok pusztulását eredményezve. Ez az érintett agyterületektől függően vezethet súlyos demenciához, mint az Alzheimer-kór esetében, vagy okozhatja az akaratlagos mozgások zavarait, mint a Parkinson-kórnál. Más betegségeknel az amiloidképződés valamilyen perifériás szervben megy végbe, ilyen például a II. típusú diabetesz, ahol az amilin nevű fehérje aggregációja a hasnyálmirigyben következik be és az inzulin-termelő β -sejtek pusztulásához vezet, súlyos anyagcseré-problémákat okozva. Végül vannak olyan amiloidképződéssel járó betegségek is, amelyeknél az aggregátumok nem egy bizonyos szervben rakódnak le, hanem több szervet is érintenek, ilyenkor szisztémás amiloidózisról beszélünk. Ilyen például a szérum amiloid A fehérjéhez kötődő AA amiloidózis (Chiti & Dobson, 2006).

Meglepő, hogy bár a betegségekhez kötődő fehérjék mérete, aminosav sorrendje és harmadlagos szerkezete nagymértékben különbözik, a kialakuló amiloidszálak mindegyik esetben hasonló, rendezett, kereszt- β -lemezes szerkezettel rendelkeznek. Ráadásul egyre több, betegségekhez nem kapcsolódó fehérjéről sikerül kimutatni, hogy kisebb-nagyobb mértékben extrém körülmények között (alacsony pH, magas hőmérséklet, nagy ionerősség stb.) *in vitro* képes olyan aggregátumokat képezni, amelyek morfológiájuk, festődésük és szerkezetük alapján amiloidszálaknak tekinthetők. Így egyre valószínűbbnek tűnik, hogy az amiloidképzés nem csupán néhány, betegségekhez kötődő fehérje sajátossága, hanem a polipeptidláncok általános jellemzője (Stefani & Dobson, 2003; Chiti & Dobson, 2006).

Az, hogy az amiloidszálak képződése pontosan hogyan történik a betegségek kialakulása során, máig nem tisztázott folyamat. Általánosságban elmondható, hogy a háttérben minden esetben valamilyen fehérje vagy peptid hibás konformációjú alakjának felszaporodása áll. Nem megfelelő térszerkezetű fehérjemolekulák megjelenése az egészséges szervezetben is előfordulhat, ez azonban rögtön komplex biológiai választ indukál, amely az ilyen molekulákat eliminálja a rendszerből. Ebben a védelemben egyrészt a *chaperon* fehérjék vesznek részt, másrészt az ubiquitin-proteasóma rendszer. Előfordulhat azonban, hogy a védekező mechanizmusokba hiba csúszik, vagy a hibás térszerkezetű fehérjemolekulák képződése olyan mértékű, hogy a szervezet már nem képes őket eltávolítani. Ilyenkor ezek a molekulák felhalmozódnak,

és amiloidszálakká aggregálódva súlyos tüneteket okoznak.

A hibás konformációjú fehérjemolekulák felszaporodása többféle okra vezethető vissza. Állhat a háttérben örökletes mutáció, aminek következtében az adott fehérje hajlamos felvenni valamilyen natívtól eltérő térszerkezetet. Ilyenkor familiáris amiloidózisról beszélünk. Más esetekben a javító mechanizmusok előregedése, csökkent hatékonysága játszik szerepet, ezeket sporadikus amiloidózisnak nevezzük. Végül pedig van a konformációs betegségeknek egy olyan csoportja, amelynél a hibás térszerkezetű fehérje kívülről jut be a szervezetbe, és az ott található egészséges fehérjéket magához hasonlóná alakítja, illetve aggregációra készíti. Ide tartoznak a prionbetegségek. Egyes betegségek sporadikusan is kialakulhatnak és örökletes tényezők is kiválthatják, ilyen például az Alzheimer- vagy a Parkinson-kór.

Az amiloidképződésről általánosságban elmondható, hogy nukleációfüggő folyamat. A szálak kialakulása során először mindig van egy lag fázis, amit egy gyors, exponenciális növekedési szakasz követ. Feltételezhetően a lag fázis során alakulnak ki a „magok”, vagyis az első aggregátumok, amikhez aztán már egyszerűen és gyorsan hozzá tudnak kapcsolódni az újabb monomer vagy oligomer fehérjemolekulák. Ennek megfelelően, ha *in vitro* amiloidképződés során előre gyártott magokat adnak a megfelelő körülmények között tartott monomer fehérjéhez, a lag fázis lerövidül vagy teljesen kimarad, mivel nincs szükség a spontán nukleációra (Chiti & Dobson, 2006).

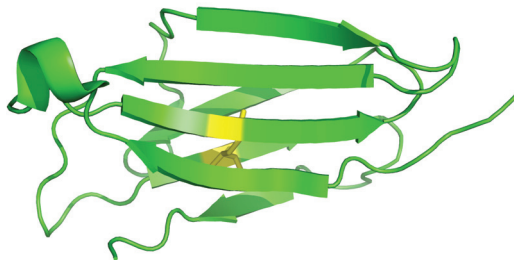
A különféle amiloidózisokban szenvedő betegekben talált, amiloidszálakból álló lerakódások alapján kézenfekvőnek tűnt, hogy ezek az aggregátumok a betegségek fő okozói. Később azonban egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy az amiloidképződés korai szakaszában kialakuló oligomerek és protofibrillumok sokkal toxikusabbak az érett szálaknál. Számos erre utaló jelet találtak például Alzheimer-kór esetében, amelynek a patomechanizmusában az amiloid prekursor protein (APP) proteolíziséből származó amiloid β ($A\beta$) peptid, illetve a tau fehérje kóros aggregációja játszik fontos szerepet. Alzheimer-kóros betegeknel megállapították, hogy a demencia mértéke sokkal inkább korrelál az $A\beta$ peptidből álló oligomerek mennyiségével, mint az érett szálakéval (Lue *et al.*, 1999; McLean *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). Az Alzheimer-kór modelljének tekinthető, APP-t túlermelő transzgenikus egereknel megfigyelték, hogy a kognitív károsodás jelei már azelőtt mutatkoznak, hogy szignifikáns mennyiségű amiloid lerakódott volna a központi idegrendszerükben (Moechars *et al.*, 1999; Larson *et al.*, 1999). Ha az ilyen egerekbe $A\beta$ elleni monoklonális antitesteket injektáltak, a tünetek enyhültek, annak ellenére, hogy a kezelés nem csökkentette az agyban található amiloid lerakódások mennyiségét. Feltehetőleg a hatás hátterében a keringésben lévő $A\beta$ oligomerek fokozott mértékű eltávolítása áll (Dodart *et al.*, 2002). További bizonyítékot találtak a fenti elméletre az Alzheimer-kór egyik örökle-

tes, fiatal korban kialakuló változatánál, ami egy APP-t érintő mutációhoz (E693G) köthető. Kimutatták ugyanis, hogy az említett mutációt tartalmazó APP variánsból származó A β peptid sokkal inkább hajlamos protofibrillumok, mint érett szálak kialakítására *in vitro* (Nilsberth *et al.*, 2001).

Természetesen a szisztémás amiloidózisok bizonyos fajtáinál továbbra is az érett szálakból álló lerakódásokat tekintjük a betegséggel járó legfőbb problémának. Ezeknél a betegségeknél sokszor olyan nagy mennyiségű amiloid rakódhat le az érintett szervekben, hogy az károsíthatja az alapvető életfunkciókat, vagy borzasztóan megnehezítheti a legegyszerűbb mindennapi tevékenységek elvégzését. Olyan esetek tartoznak ide, amelyeknél a nyelvben felhalmozódó amiloid nyelési nehézségeket okoz, vagy az ízületekben található lerakódások miatt a legkisebb mozgások is fájdalommal járnak (Pepys, 2001).

A korai aggregátumok káros hatásai bizonyos amiloidképződéssel járó betegségeknél több okra vezethetők vissza. Ezekben a natívtól eltérő konformációjú fehérjemolekulákat tartalmazó oligomerekben nagy arányban találhatók a felszínen olyan oldalláncok, amelyek a natív globuláris fehérjéknél a molekula belsejében elrejtve, illetve a rendezetlen fehérjéknél a polipeptidláncban elszórta találhatók. Ezek az oldalláncok kölcsönhatásba léphetnek a membránokkal, más fehérjékkel vagy egyéb makromolekulákkal, és végső soron a sejt belső egyensúlyának felborulását és végül a sejt pusztulását okozhatják (Chiti & Dobson, 2006).

Végül fontos megemlíteni, hogy a természetben amiloid jellegű struktúrák nem csak betegségekhez kapcsolódva fordulnak elő. Megfigyeltek olyan eseteket, amikor az amiloidszálak kifejezetten hasznos funkciót töltenek be az adott sejtben vagy szervezetben. Több baktérium- és gombafajnál leírták, hogy különböző fehérjékből fonalakat hoznak létre, amelyek segítik őket a felületek kolonizálásában, a gazdas sejtek fehérjéihez való kapcsolódásban vagy a spórák terjesztésében. Morfológiai és szerkezeti vizsgálatok alátámasztották, hogy ezek a fonalak amiloidnak tekinthetők (Mackay *et al.*, 2001; Chapman *et al.*, 2002; Claessen *et al.*, 2003). Hasonló tulajdonságokkal rendelkeznek azok a chorion fehérjéből álló szálak, amelyek a selyemlepke (*Bombyx mori*) petéjében találhatók és a fejlődő lárvá védelmét szolgálják (Iconomidou *et al.*, 2000). Még ennél is meglepőbb, hogy az emberi szervezetben is leírtak hasonló eseteket. Egyik ilyen példa a melanoszómban történő amiloidképződés. Ezekben a sejtorganellumokban a Pmel17 nevű integráns membránfehérje membránon belüli szakaszát a proprotein konvertáz enzim lehasítja, és a keletkező peptid a melanoszóma üregében amiloid jellegű fonalakat hoz létre; a folyamatnak a melaninszintézis elősegítésében van szerepe (Berson *et al.*, 2003). Hasonlót figyeltek meg peptid hormonok esetében, amelyek a szekréciós granulumokban amiloid-szerű konformációban tárolódnak, innen szabadulnak fel szükség esetén a monomer, funk-



1.1. ábra. A β_2 -MIKROGLOBULIN MOLEKULA SZERKEZETE.

A diszulfidhidat sárga szín jelöli. Az ábra a 2YXF kristályszerkezet (Iwata *et al.*, J. Biochem., 2007), valamint a PyMol szoftver (DeLano Scientific LLC, South San Francisco, CA) felhasználásával készült.

cionális molekulák (Maji *et al.*, 2009). Ezek a példák bizonyítják, hogy megfelelően kontrollált körülmények között az amiloidszálak még magasabb rendű szervezetekben is tölthetnek be élettanilag hasznos funkciókat.

1.2. A vesedialízishez kötött amiloidózis

Az amiloidképződéssel járó betegségek közé tartozik a vesedialízishez kötött amiloidózis (*dialysis-related amyloidosis*, DRA), amely a β_2 -mikroglobulin (β_2m) kóros aggregációjára vezethető vissza. A β_2m egy 11,8 kDa molekulatömegű, 99 aminosavból álló fehérje. Tipikus β -szendvics szerkezetű, két antiparallel β -lemez alkotja, amelyeket egy diszulfidhíd köt össze (1.1. ábra). Minden sejtmaggal rendelkező humán sejt felszínén megtalálható, a fő hisztokompatibilitási komplex-I (MHC-I) könnyű láncát alkotja. A komplexről disszociálva monomer formában a vérbe kerül, végül a vesében lebomlik. A hosszú ideig vesedialízisben részesülő betegek vérében a β_2m szintje megemelkedik, mivel a dialízismembrán nem tudja kiválasztani. Egészséges embereknél a β_2m átlagos koncentrációja a szérumban 1,5–3 mg/l. Ezzel szemben az évek óta vesedialízisben részesülő betegek vérében ez a szint elérheti a 20–50 mg/l-t, de kivételes esetekben 100 mg/l-nél magasabb β_2m koncentrációkat is mértek. Ekkor a fehérje amiloid típusú aggregátumokat képez, amelyek elsősorban az ízületekben rakódnak le, súlyos mozgásszervi problémákat okozva. Ezáltal a DRA az első olyan amiloidképződéssel járó betegség, amely orvosi beavatkozás hatására alakul ki (Drüeke & Massy, 2009).

A DRA többféle tünetben is megnyilvánulhat, ezek a dialízis előrehaladásával egyre súlyosabbá válnak. Az ízületekben lerakódó amiloid krónikus ízületi gyulla-

dást okoz, ami erős fájdalommal jár. A betegség jellemző megjelenési formája a kéztőcsatorna szindróma (*carpal tunnel syndrome*), ilyenkor a kéztőcsatornában lerakódó amiloid hatására bekövetkező gyulladás miatt a szövetek megduzzadnak, és a csatornában futó ideg összenyomódik. Ez fájdalomhoz, zsibbadáshoz, mozgási nehézségekhez, súlyosabb esetben a beidegzett izmok sorvadásához vezet. DRA-s betegeknel gyakran megfigyelték csontciszták kialakulását is, ezeknek a száma és mérete szintén nő a dialízisterápia előrehaladásával. Esetenként ezek a ciszták a csontok fokozott törékenységet okozhatják. Végül a lerakódások bizonyos esetekben nemcsak a mozgásszervrendszerben jelennek meg, hanem különféle perifériás szervekben is, mint a szív, a tüdő, a gasztrointesztinális rendszer vagy az erek. A lerakódó amiloid ilyenkor alapvető életfunkciókat károsíthat, ami végső soron a beteg halálához is vezethet (Yamamoto & Gejyo, 2005).

A DRA tüneteinek enyhítésére többféle kezelés létezik. Ezeknek az első csoportja a $\beta 2m$ hatékonyabb eltávolítását célozza meg a keringésből. Ezt egyrészt a dialízismembránok fejlesztésével igyekeznek elérni, másrészt olyan adszorpciós oszlopok alkalmazásával, amelyek specifikusan a $\beta 2m$ -t eliminálják a szérumból. A vizsgálatok alapján ezek a technikák ígéretesnek tűnnek. A nagy teljesítményű (*high-flux*) membránok hatékonyabb $\beta 2m$ -kiválasztást tesznek lehetővé, ezáltal késleltetve a DRA tüneteinek kialakulását (van Ypersele de Strihou *et al.*, 1994; Aoike *et al.*, 1995; Hakim *et al.*, 1996; Pickett *et al.*, 2002). Kimutatták továbbá, hogy az adszorpciós oszlopok kezelésben részesülő páciensek vérében szignifikánsan nagyobb mértékben csökkent a $\beta 2m$ koncentrációja a kontroll csoporthoz képest, az izületi gyulladásal kapcsolatos tüneteik pedig enyhültek (Kazama *et al.*, 2001; Abe *et al.*, 2003; Gejyo *et al.*, 2004). Mindazonáltal, az ilyen kezelések hatékonysága továbbra sem összemérhető az egészséges veseműködés során végbemenő $\beta 2m$ -kiválasztás mértékével. A betegek tüneteit gyógyszeres kezeléssel is igyekeznek enyhíteni, az adrenokortikoszteroidok eredményesnek bizonyultak a gyulladás és a fájdalom csökkentésében. Sajnos azonban az ilyen gyógyszerek hosszú távon nem alkalmazhatók, mert súlyos komplikációk léphetnek fel, például megnő a fertőzésekre való hajlam vagy a csonttrikulás esélye. Esetenként szükségessé válhat a sebészeti beavatkozás is, például kéztőcsatorna szindróma esetén, a csatornában futó idegre nehezedő nyomás csökkentése érdekében. Végül pedig a DRA-s betegek számára megoldást jelenthet a veseátültetés. Több vizsgálat kimutatta, hogy a sikeres transzplantációt követően fokozatosan csökkentek a betegekben található amiloid lerakódások (Nelson *et al.*, 1991; Tan *et al.*, 1996). Mások viszont arról számoltak be, hogy ez a módszer hatástalannak bizonyult a DRA következtében kialakult csontciszták elmulasztásában (Jadoul *et al.*, 1989; Campistol *et al.*, 1992; Bardin *et al.*, 1995; Mourad & Argiles, 1996). További problémát jelent veseátültetésnél, hogy számolni kell az esetleges ki-

lökődési reakcióval vagy az alkalmazott immunszuppresszív gyógyszerek által okozott komplikációkkal, és hogy sokszor évekig kell várni a megfelelő donorra (Yamamoto & Gejyo, 2005).

Mindmáig nem tisztázott, pontosan milyen tényezők váltják ki a β 2m aggregációját a DRA-s betegekben. A megemelkedett fehérjekoncentráció nyilvánvalóan fontos szerepet játszik, azonban ez önmagában még nem elég az amiloidképződéshez. Kimutatták ugyanis, hogy bár a β 2m alacsony pH-n spontán képes amiloidszállakká aggregálódni *in vitro* (Naiki *et al.*, 1997), fiziológiás pH-n ez akkor sem következik be, ha a fehérje koncentrációja többszöröse a DRA-s betegekben mért értékeknek (McParland *et al.*, 2000). Éppen ezért valószínűnek látszik, hogy egyéb, szervezetben jelen lévő molekuláknak is szerepe van a folyamatban.

Az elmúlt években több vegyületről kimutatták, hogy képes kiváltani a β 2m amiloidképzését fiziológiás pH-n *in vitro*. Több tanulmány jelent meg a gliukózaminoglikánok (Ohashi *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2004; Myers *et al.*, 2006), a kollagén (Homma *et al.*, 1989; Giorgetti *et al.*, 2005; Relini *et al.*, 2006), az apolipoprotein E (Yamaguchi *et al.*, 2001) és a szérum amiloid protein (Ono & Uchino, 1994) lehetséges szerepéről a β 2m amiloidszálak kialakulásában. A Cu^{2+} -ionokról szintén kimutatták, hogy képesek indukálni a β 2m amiloidképzését *in vitro*. Ezzel összefüggésben azt is megfigyelték, hogy azoknál a betegekknél, akiknél a dialízismembrán nem tartalmazott Cu^{2+} -ionokat, kevésbé alakultak ki a DRA tüneteinek (Morgan *et al.*, 2001; Eakin *et al.*, 2002; Villanueva *et al.*, 2004). Az SDS-ről és a trifluoroetanolról (TFE) szintén leírták, hogy képesek elősegíteni a β 2m amiloidszálak kialakulását fiziológiás pH-n *in vitro*, amiloid magok jelenlétében. Ookoshi és munkatársai azt vizsgálták, hogy az SDS-hez hasonló szerkezetű lizofoszfolipidek közül melyek képesek indukálni a β 2m aggregációját, ha SDS jelenlétében növesztett szálaból létrehozott magokat adtak az oldatokhoz. Ezekben a vizsgálatokban a lizofoszfatidsavak különböző fajtái bizonyultak a leghatékonyabbnak (Oookoshi *et al.*, 2008). Hasegawa és munkatársai a szintén amfipatikus szerkezetű zsírsavak amiloidogén hatását mutatták ki (Hasegawa *et al.*, 2008). Végeztek megfigyeléseket a különböző vegyületek együttes hatásairól is, Relini és munkatársai például leírták, hogy a heparin jelenléte jelentősen felgyorsítja a kollagén hatására végbemenő amiloidképződést (Relini *et al.*, 2007). Valószínűnek tűnik, hogy az élő szervezetben is több faktor együttes hatása játszik szerepet a β 2m polimerizációjában a DRA kialakulása során.

1.3. Lipid-fehérje kölcsönhatások szerepe az amiloidképződésben

A lipid-fehérje kölcsönhatások szerepét az amiloidképződéssel járó betegségekben más kutatócsoportok is tanulmányozták. Az egyik legátfogóbb munkát Gellerman és munkatársai végezték, akik különböző amiloidózisokban szenvedő páciensekből izoláltak amiloid lerakódásokat, és részletesen megvizsgálták a szálakhoz kapcsolódó lipidkomponenseket. Összesen 27 mintát vizsgáltak meg, amelyek öt különféle extracelluláris amiloid lerakódásból származtak. Megállapították, hogy az általuk tanulmányozott minták mindegyike jelentős mennyiségben tartalmaz lipideket, egyes minták lipidtartalma elérte a 12%-ot. A lerakódásokban talált lipidkomponensek kémiai összetétele a lipidraftokéra emlékeztetett; általában legnagyobb mennyiségben koleszterint és szfingomielint tartalmaztak, és csak kis mennyiségben voltak bennük megtalálhatóak a polárosabb lipidek, mint például a foszfatidilkolin vagy a foszfatidiletanolamin. Érdeemes megemlíteni, hogy az általuk vizsgált egyetlen $\beta 2m$ amiloidszálat tartalmazó minta lipidösszetétele jelentős mértékben különbözött a többi mintáétól (Gellerman *et al.*, 2005).

A lipidek szerepét az amiloidszálak kialakulásában részletesen áttekintette Gorbenko és Kinnunen, bár ők munkájukban elsősorban a membánlipidekre összpontosítottak (Gorbenko & Kinnunen, 2006). Taylor és Hooper a lipidraftok Alzheimer-kórban és prionbetegségekben betöltött szerepét foglalta össze (Taylor & Hooper, 2007). Továbbá a közelmúltban jelent meg Coutinho és munkatársainak tanulmánya, amelyben a FRET alkalmazási lehetőségeit tekintik át az amiloid jellegű lipid-fehérje aggregátumokban, ez szintén a téma fontosságát és aktualitását jelzi (Coutinho *et al.*, 2011).

A lipidek hatását a különféle fehérjék amiloidképzésére *in vitro* vizsgálatok is alátámasztották. Hagihara és munkatársai kimutatták, hogy az SDS és az anionos lizofoszfolipidek indukálják a $\beta 2$ -glikoprotein aggregációját (Hagihara *et al.*, 2002). Alakoskela és munkatársai leírták, hogy a citokróm c anionos foszfolipidek hatására amiloid-szerű szálakat képez (Alakoskela *et al.*, 2006). Bár ezeknek az eredményeknek nincsen közvetlen élettani relevanciája, megerősítik, hogy érdemes és fontos tanulmányozni a lipideknek az amiloidképződésben betöltött szerepét.

1.4. A lizofoszfatidsav

A lizofoszfatidsav (LPA) egy általánosan elterjedt lizofoszfolipid mediátor, amely minden eukarióta szövetben megtalálható, és rendkívül széleskörű biológiai aktivitással rendelkezik. Először 1957-ben azonosították simaizom-stimuláló vegyületként

(Vogt, 1957a; Vogt, 1957b), azóta számos további hatását fedezték fel mind fiziológiás, mind patológiás folyamatokban. Többek között fontos szerepe van a sejtek osztódásában, differenciációjában, mozgásában és apoptózisában, de a rák egyes fajtáival és az érlemeszesedéssel is kapcsolatba hozták (Tokumura, 2002; Tigyi & Parrill, 2003; Sengupta *et al.*, 2004).

Az LPA hatásait jelentős részben sejtfelszíni, G-fehérje-kapcsolt receptorokon keresztül fejti ki. Hosszú ideig három ilyen receptor volt ismert, amelyek az Edg (endothelial differentiation gene) receptorcsaládhoz tartoznak, és nagy homológiát mutatnak a szfingozin-1-foszfát (S1P) receptorokkal (LPA1/EDG2, LPA2/EDG4 és LPA3/EDG7). Később felfedezték az LPA receptorok újabb három képviselőjét, amelyek a P2Y receptorcsalád tagjai (LPA4/P2Y9/GPR23, LPA5/GPR94 és LPA6/P2Y5). Végül a közelmúltban két további molekulát, a GPR87-t és P2Y10-t is LPA receptorként azonosítottak. Kimutatták továbbá, hogy a PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) az LPA intracelluláris receptora. A jövőben további, eddig ismeretlen LPA receptorok felfedezése is elképzelhető (Choi *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2010; Okudaira *et al.*, 2010; Tigyi, 2010).

Az LPA a szervezetben többféle módon keletkezhet. A vérplazmában elsősorban az autotaxin (lizofoszfolipáz D) enzim hozza létre lizofoszfatidilkolinból (LPC). LPA létrejöhet foszfatidsavból (PA) is, a különböző foszfolipáz A enzimek (PLA1 és PLA2) aktivitása által. Mivel a PA alapvetően membránokban található, az LPA-nak ez a keletkezési módja membránokhoz kötötten fordul elő, például a különböző vörsejtekben. Végül LPA keletkezhet még az alacsony sűrűségű lipoprotein (*low density lipoprotein*, LDL) oxidatív módosítása által. Az ilyen módon megváltozott LDL aktiválja a vérlemezkéket és az érfal endotél sejtjeit, a folyamatnak fontos szerepe van az érlemeszesedés és az ahhoz kapcsolódó trombózis kialakulásában (Tigyi & Parrill, 2003; Aoki, 2004; Aoki *et al.*, 2008).

Az elmúlt néhány évben az LPA hatásainak kutatása robbanásszerű fejlődésen ment keresztül, folyamatosan újabb és újabb élettani és patológiás folyamatokban fedezik fel szerepét. Az LPA-hoz kötődő sejtelettani és jelátviteli folyamatoknak, illetve az ezekkel kapcsolatos betegségek patomechanizmusának jobb megértése számos új terápiás lehetőséggel kecsegtet (Tigyi, 2010).

Célkitűzések

Munkánk célja a β 2m – LPA kölcsönhatás részletes mechanizmusának felderítése volt. A kutatás az alábbi három fő téma köré összpontosult.

1. A munka első szakaszában az volt a célunk, hogy különböző biokémiai-biofizikai módszerekkel minél alaposabban jellemezzük a β 2m – LPA kölcsönhatást. Többek között olyan kérdésekre kerestük a választ, hogy hogyan befolyásolja az amiloidképződés mértékét az LPA koncentrációja, vagy hogy mi a kölcsönhatás sztöchiometriája és egyensúlyi disszociációs állandója. Megvizsgáltuk továbbá, hogy az LPA jelenléte milyen szerkezeti változásokat okoz a fehérjében, valamint hogy a lipid monomer vagy micella formájában vesz részt a kölcsönhatásban. Ezeknek a kérdéseknek a megválaszolására olyan módszereket alkalmaztunk, mint a fluoreszcencia és a CD spektroszkópia, a DSC, az ITC vagy a limitált proteolízis.
2. Folytatásként azt tűztük ki célul, hogy meghatározzuk az LPA fontosabb kötőhelyeit a β 2m felszínén. Először *in silico* dokkolási kísérleteket végeztünk, hogy megjósoljuk a lehetséges kötőhelyeket. Majd a dokkolás eredményeit alapul véve irányított mutagenézissel olyan β 2m variánsokat állítottunk elő, ahol egy-egy lizint vagy arginint alaninra cseréltünk. Ezután Thioflavin T fluoreszcenciás mérésekkel megvizsgáltuk, hogy a mutációk hogyan befolyásolják a fehérje LPA jelenlétében történő amiloidképzését, vagyis hogy az adott oldalláncnak milyen szerepe van a lipid kötésében. Az LPA hatására történő szerkezeti változásokat CD spektroszkópiával vizsgáltuk az egyes variánsoknál. A fenti kísérleteket SDS-sel is elvégeztük, ami az LPA szerkezeti analógjának tekinthető.
3. Végül arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az alacsony pH-n és a fiziológiás körülmények között, LPA jelenlétében növesztett amiloidszálak különböznek-e egymástól. A szálak morfológiáját transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk, a szerkezeti összehasonlítást FTIR spektroszkópiával végeztük. Végül arra voltunk kíváncsiak, hogy az LPA jelenlétében növesztett szálak semleges pH-n stabilabbak-e mint az alacsony pH-n növesztett szálak, vagy azokhoz hasonlóan rövid idő alatt lebomlanak. Hogy ezt kiderítsük, a szálakat többszöri

mosás után semleges pH-jú, lipidmentes pufferral hígítottuk, és Thioflavin T fluoreszcenciás mérésekkel vizsgáltuk a megmaradt szálak mennyiségét.

Anyagok és módszerek

3.1. Klónozás és irányított mutagenézis

A humán $\beta 2m$ génjét Chiba és munkatársai klónozták cDNS könyvtárból pAED4 vektorba (Doering & Matsudaira, 1996; Chiba *et al.*, 2003). A $\beta 2m$ mutánsokat irányított mutagenézissel állítottuk elő. A K6A variáns esetében az 5' primer tartalmazta a kívánt mutációt, a többi esetben megaprimer mutagenézist alkalmaztunk. A PCR reakciók során használt primereket a 3.1 táblázat tartalmazza. A $\beta 2m$ variánsok génjét tartalmazó plazmidokat *E. coli* DH5 α sejtekben (Novagen Inc., Madison, WI) állítottuk elő. A rekombináns DNS technikákat standard előírások alapján végeztük (Sambrook & Russell, 2000). Az elkészült konstrukciókat szekvenálással ellenőriztük (Biomi Kft., Gödöllő).

3.2. A fehérjék előállítása

A rekombináns fehérjéket *E. coli* BL21(DE3)pLysS törzsében (Novagen Inc., Madison, WI) expresszáltuk. A sejteket hősokkal (1 min, 42 °C) transzformáltuk, majd LB-médiumban, 37 °C-on, folyamatos rázatás közben növesztettük 100 μ g/ml ampicillin és 30 μ g/ml chloramphenicol jelenlétében. A logaritmusos fázisban ($A_{600\text{nm}} \approx 0,6$) 0,8 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk a fehérjetermelést, majd a sejteket további 3 órán át növesztettük. Ezután a sejteket lecentrifugáltuk (4 °C, 15 min, 10000 g), és a folyadékkultúra tizedének megfelelő térfogatú TE pufferben (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5) felfuszpendáltuk. A sejtek feltárását jégen, 0,1% Triton X-100 jelenlétében ultrahangos szonikálással végeztük (Microson szonikátor, Misonix, Farmingdale, NY; 5-ös intenzitás, 3×40 sec). Az inklúziós testeket lecentrifugáltuk (18500 g, 30 min, 4 °C), a sejtörmelékét a felülúszóval együtt eltávolítottuk. A mosást még kétszer megismételtük.

3.3. A fehérjék renaturálása

A fehérjéket 10 mg/ml koncentrációban feloldottuk 6 M guanidin-HCl-t tartalmazó Tris pufferben (100 mM Tris, pH 8,3), és 3 napig 4 °C-on kevertettük, hogy

3.1. táblázat. A MUTAGENEZIS SORÁN HASZNÁLT PRIMEREK. A primerek a következő sorrendben vannak feltüntetve: forward (5' → 3') primer, reverse (3' → 5') primer, megaprimer. A K6A variáns esetében az (5' → 3') primer tartalmazta a mutációt. A forward primerek NdeI, a reverse primerek BamHI NdeI hasítóhelyet tartalmaztak. A mutációt hordozó tripleteket aláhúzás, a klónozáshoz használt restriktációs endonukleázok hasítóhelyét félkövér kiemelés jelöli.

K6A	ATACATATGATCCAGCGTACTCCAGCGATTTCAGGTTTACTCACG GGGGATCCTTACATGTCTCGATC
R12A	ATACATATGATCCAGCGTAC GGGGATCCTTACATGTCTCGATC GATTTCAGGTTTACTCAGCGCATCCAGCAGAGAATGG
K19A	ATACATATGATCCAGCGTAC GGGGATCCTTACATGTCTCGATC CCAGCAGAGAATGGAGCGTCAAATTTCTCTGAATTG

a diszulfid-hidak kialakuljanak. Ezután az oldatokat Tris-pufferrel (50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,4) cseppenként, 4 °C-on ötszöröseére hígítottuk, hogy elkerüljünk a fehérjék kicsapódását. Végül a fehérjéket Tris-pufferben (10 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7,4), majd desztillált vízben dializáltuk és liofilizáltuk.

3.4. A fehérjék tisztítása

A fehérjéket anioncserélő kromatográfiával és géliszűrőssel tisztítottuk. Az anioncserét Mono Q 5/50 GL oszloppal (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) végeztük 20 mM Tris pufferben (pH 7,8 a vad típusú, pH 7,6 a mutáns fehérjéknél), az eluáláshoz 0–1 M NaCl gradienst használtunk. A géliszűrést HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR oszloppal (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) végeztük Na-foszfát pufferben (50 mM Na-foszfát, 150 mM NaCl, pH 7,4). A fehérje-oldatok tisztaságát SDS poliakrilamid gélelektroforézissel és electrospray ionizációs tömegspektrometriával ellenőriztük, standard előírások alapján (Simpson, 2002). A fehérjék natív szerkezetének kialakulását CD spektroszkópiával igazoltuk.

3.5. A β 2m polimerizációjának vizsgálata

3.5.1. β 2m amiloidszálak előállítása alacsony pH-n

A szálak növesztését citrát pufferben (50 mM Na-citrát, 100 mM NaCl, pH 2,5) végeztük úgy, hogy a β 2m monomerekhez amiloidmagokat adtunk 5 μ g/ml koncentrációban, a fehérje végső koncentrációja az oldatokban 0,1 mg/ml volt. A mago-

kat 100 μ l 0,1 mg/ml koncentrációjú β 2m amiloidoldatot jégen történő szonikálásával állítottuk elő (Microson szonikátor, Misonix, Farmingdale, NY; 2-es intenzitás, 50 \times 1 sec). A magok hozzáadása után a mintákat 3 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk (Naiki *et al.*, 1989; Naiki & Gejyo, 1999). A szálak növekedését Thioflavin T fluoreszcenciás mérésekkel ellenőriztük. A magok előállítását és az amiloidképződés detektálását a többi polimerizációs vizsgálatban is hasonlóan történt.

3.5.2. A β 2m polimerizációjának vizsgálata különböző lipidek jelenlétében

A lipideket az Avanti Polar Lipids-től (Alabaster, AL) szereztük be. A szálak növesztését Na-foszfát pufferben végeztük (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4). Magként szonikált, 0,4 mg/ml koncentrációjú, pH 2,5-n növesztett amiloidoldatot használtunk 20 μ g/ml koncentrációban, a fehérje végső koncentrációja az oldatokban 0,1 mg/ml volt. A minták ezen kívül 500 μ M koncentrációban tartalmaztak valamilyen lipidet (lizofoszfatidsav, LPA; lizofoszfatidilkolin, LPC; szfingozin-1-foszfát, S1P; szfingozilfoszforilkolin, SPC) vagy SDS-t. A lipidek 10 mM metanolos törzsolatából megfelelő mennyiséget beszárítottunk, majd intenzív szonikálással és vortexeléssel feloldottuk a reakciópufferben. Az S1P-t rossz oldhatósága miatt nem szárítottuk be, hanem a metanolos törzsolatból hígítottuk a pufferrel. A lipidés kísérletekhez olyan speciális csöveket használtunk, amelyeknek az anyaga meggátolta a lipidek kitapadását (Costar Low Binding Snap Cap Microcentrifuge Tube, Corning Inc., Corning, NY). A magok hozzáadása után a mintákat 37 °C-on inkubáltuk, és az idő függvényében vizsgáltuk az amiloidképződést.

3.5.3. A β 2m polimerizációjának vizsgálata LPA jelenlétében

Az LPA által indukált amiloidképződés részletes vizsgálatához LPA jelenlétében növesztett amiloidszálakat szonikáltunk, és az így létrehozott magokat adtuk a β 2m monomerekhez 10 μ g/ml koncentrációban. A kísérletekben az ötödik ciklusból származó magokat használtunk. A mérések többi részlete a fent leírtakhoz hasonlóan történt.

3.6. Fluoreszcencia spektroszkópia

3.6.1. Thioflavin T (ThT) fluoreszcencia

A fluoreszcencia spektroszkópiás méréseket egy Fluoromax (SPEX Industries, Edison, NJ) fluoriméterrel végeztük. A mintákból 5 μ l-t elkevertünk 5 μ M ThT-t tartalmazó glicines pufferrel (50 mM glicin, 100 mM NaCl, pH 8,5), és 445 nm-en

történő gerjesztés mellett 485 nm-en detektáltuk a fluoreszcencia intenzitást. A méréseket 25 °C-on végeztük, a gerjesztési rés 5 nm, az emissziós rés 10 nm volt (Naiki *et al.*, 1989; Naiki & Gejyo, 1999).

3.6.2. 8-anilínophtalene-1-sulfonik acid (ANS) fluoreszcencia

A kísérlet során 5 μ M ANS festéket tartalmazó, 0,1 mg/ml koncentrációjú β 2m oldatokat inkubáltunk 300 μ M LPA jelenlétében, illetve anélkül 37 °C-on, Na-foszfát pufferben (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4). A gerjesztést 380 nm-en végeztük, és 400-600 nm között detektáltuk az emissziós spektrumokat 5 min, 2 h és 24 h elteltével. A gerjesztési és az emissziós rés is 5 nm volt.

3.7. Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia

A CD spektroszkópiás méréseket egy Jasco J-720 spektropolariméteren (Japan Spectroscopic Co., Tokyo, Japan) végeztük. A spektrumokat 200-240 nm között vettük fel 10 nm/min sebességgel, 37 °C-on, a fényút hossza 1 mm volt. A mintáink 0,1 mg/ml β 2m-t, valamint 0-700 μ M LPA-t, illetve 500 μ M LPC-t tartalmaztak Na-foszfát pufferben (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4). Ezen kívül tanulmányoztuk 300, illetve 500 μ M LPA jelenlétében növesztett amiloidszálak CD spektrumát is. A másodlagos szerkezeti elemek arányának meghatározása a Dicroprot (Deléage & Geourjon, 1993) és a GlobalWorks (Olis Inc., Bogart, GA) szoftvercsomagok segítségével történt.

3.8. Transzmissziós elektronmikroszkópia

Az amiloidszálak vizsgálatát egy JEOL 100 CX II (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) transzmissziós elektronmikroszkóppal végeztük. A mintákból 10 μ l-t cseppentettünk a rostélyra, és 60 sec-ig inkubáltuk, hogy a szálak kikötődjenek. Ezután a felesleges folyadékot szűrőpapírral eltávolítottuk, majd a mintákat 40 sec-ig 1% uranil-acetáttal festettük. A felesleges festék eltávolítása után a preparátumokat 60 kV gyorsítófeszültséggel vizsgáltuk.

3.9. Differenciális pásztázó kalorimetria

A méréseket egy VP-DSC (MicroCal Inc., Northampton, MA) műszeren végeztük, a denaturációs görbéket 10 °C és 80 °C között vettük fel 1 °C/min fűtési sebességgel. A minták 0,2 mg/ml fehérjét tartalmaztak Na-foszfát pufferben (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4), a denaturációt különböző koncentrációjú LPA

(50 μ M, 100 μ M, 200 μ M), illetve 500 μ M LPC jelenlétében tanulmányoztuk. Az eredmények értékelése Origin 7.0 for DSC (MicroCal Inc., Northampton, MA) szoftverrel történt.

3.10. Izotermális titrációs kalorimetria (ITC)

3.10.1. Az LPA kritikus micella koncentrációjának meghatározása

A méréseket egy VP-ITC (MicroCal Inc., Northampton, MA) műszerrel végeztük 37 °C-on, Li és munkatársaiéhoz hasonló módon (Li *et al.*, 2004). A Na-foszfát puffert (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4) tartalmazó kalorimetriás cellába 1 mM koncentrációjú LPA oldatból 2 μ l-eket injektáltunk, és detektáltuk a hőváltozásokat. A kritikus micella koncentrációnak azt a lipidkoncentrációt tekintettük, amelynél az injektálást kísérő hőváltozás kevesebb volt, mint a kiindulási, maximális érték 5%-a.

3.10.2. A β 2m – LPA kölcsönhatás vizsgálata

A kalorimetriás cella 300 μ M LPA-t tartalmazott Na-foszfát pufferben (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4), ebbe injektáltunk bele 470 μ M koncentrációjú monomer β 2m-t. Az egyes injektálások között 1 óra telt el. Az eredményeket értékelése Origin 7.0 for ITC (MicroCal Inc., Northampton, MA) szoftverrel történt.

3.11. Limitált proteolízis

0,2 mg/ml koncentrációjú β 2m-t 1 órán keresztül 37 °C-on inkubáltunk Na-foszfát (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4) vagy HEPES (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,4) pufferben különböző koncentrációjú (0–300 μ M) LPA jelenlétében. Ezután szarvasmarha α -kimotripsint (Worthington Biochemical Co., Lakewood, NJ) adtuk a mintákhoz 1:100 enzim :szubsztrát moláris arányban. 30 perc elteltével a reakciót kétszer tömény redukáló SDS mintapuffer hozzáadásával, és az ezt követő melegítéssel (95 °C, 5 min) leállítottuk. A proteolitikus fragmentumokat 16,5%-os SDS poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el Tris/Tricin pufferben (Schägger & von Jagow, 1987; Lesse *et al.*, 1990). A mintákat 30 percig fixáltuk 50% metanolt és 9% ecetsavat tartalmazó oldatban, majd egy éjszakán át festettük Brilliant Blue G festékkel 5% metanol és 7% ecetsav jelenlétében.

3.12. Az amiloidszálak stabilitásának vizsgálata hőkezeléssel

Az amiloidszálak hőkezelés hatására bekövetkező disszociációjának kinetikáját pH 2,5-n, Na-citrát pufferben (50 mM Na-citrát, 100 mM NaCl) növesztett szálakon tanulmányoztuk. 0,1 mg/ml koncentrációjú száloldatokat a megfelelő hőmérsékleteken inkubáltunk egy Hybaid PCR Sprint (Mandel Scientific, Canada) PCR-készülék segítségével, és a szálak lebomlását ThT fluoreszcenciás mérésekkel követtük az idő függvényében.

A különböző adalékanyagok hatásának vizsgálatához szintén pH 2,5-n, Na-citrát pufferben növesztett amiloidszálakat használtunk. A szálakat lecentrifugáltuk (4 °C, 10 min, 100000 g), majd 0,1 mg/ml koncentrációban felfuszpendáltuk olyan Na-citrát pufferben, amely 500 μ M lipidet (LPA, LPC vagy SPC) vagy SDS-t tartalmazott. Ezek után a mintákból 20 μ l-eket különböző hőmérsékleteken (25–99 °C) hőkezeltünk, majd 5 perc elteltével jégbe hűtéssel leállítottuk a depolimerizációt. A megmaradt amiloidszálak mennyiségét ThT fluoreszcenciás mérésekkel vizsgáltuk.

3.13. Szálak stabilitásának vizsgálata pH 7,4-n

A méréshez 300 μ M LPA jelenlétében növesztett amiloidszálakat használtunk az ötödik ciklusból. A szálakat lecentrifugáltuk (4 °C, 10 min, 100000 g), majd 0,05 mg/ml koncentrációban felfuszpendáltuk lipidmentes Na-foszfát pufferben (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4). A mosást még négyszer megismételtük, hogy az LPA-t teljesen eltávolítsuk. Ezután a szálakat olyan pufferben vettük fel, amely különböző koncentrációban (0–300 μ M) tartalmazott LPA-t. A mintákat ezután 37 °C-on inkubáltuk, és 2 hónapon keresztül követtük a depolimerizáció mértékét ThT fluoreszcenciával.

3.14. Kémiai keresztkötés

A keresztkötéses kísérleteket DTSP-vel [dithiobis(succinidyl propionate)] végeztük. A 0,1 mg/ml koncentrációjú β 2m-t 2 órán keresztül előinkubáltuk 300 μ M LPA-val 37 °C-on Na-foszfát pufferben (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4), majd hozzáadtuk a DTSP-t úgy, hogy a β 2m : DTSP tömegarány 2:1 volt. 1 óra 37 °C-on történő inkubáció után a reakciót leállítottuk a DTSP-hez képest 50-szeres mennyiségű (mol/mol) glicin hozzáadásával. 30 perc inkubáció után a keresztkötést SDS poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük nem redukáló körülmények között. Pozitív kontrollnak *Thermus thermophilus* 3-izopropilmalát dehidrogenáz (IPMDH)

enzimet választottuk, ami egy olyan dimer fehérje, amely két azonos 37 kDa-os alegységből áll.

3.15. FTIR spektroszkópia

A mérésekhez egy FT-600 (Jasco Inc., Easton, MD) készüléket használtunk. Mintáink alacsony pH-n, illetve fiziológiás pH-n, 300 μ M LPA jelenlétében növesztett amiloidszálakat tartalmaztak 0,1 mg/ml koncentrációban. A szálakat először lecentrifugáltuk (4 °C, 10 min, 100000 g), majd felfuszpendáltuk a megfelelő (Na-citrát, illetve Na-foszfát), D₂O-t tartalmazó pufferben. A mosást még kétszer megismélteltük. A szálak közötti szerkezeti különbségek vizsgálatát a spektrumok amid I csúcsának (1600–1700 cm⁻¹) összehasonlításával végeztük.

3.16. Dokkolási számítások

A ligandummolekulák dokkolását az AutoDock 3.05 és az AutoDock Tools programcsomag segítségével végeztük (Morris *et al.*, 1998). A számításokhoz a Protein Data Bankból származó 1LDS fehérjeszerkezetet (Trinh *et al.*, 2002) használtuk, amelyből minden, nem a fehérjéhez tartozó atomot eltávolítottunk, a poláros atomokhoz kapcsolódó hidrogénatomokat pedig az AutoDock Tools segítségével adtuk hozzá. A fehérjeatomokhoz Kollman parciális töltéseket rendeltünk. A dokkoláshoz használt ligandumokat a MarvinSketch¹ program segítségével hoztuk létre, ami a szerkezet előállításából, a geometriai optimalizációból, a pH 7,4-nek megfelelő protonáltsági állapot beállításából és az atomi parciális töltések kiszámolásából állt. A dokkolási rácsot (*grid*) úgy állítottuk be, hogy a fehérje teljes felületéhez engedjen hozzáférést a ligandum számára. Az AutoDock által megvalósított lamarcki genetikus algoritmust használtuk a dokkoláshoz, a populációméretet 250-re, az energia-kiértékelések maximális számát 20 millióra állítottuk, hogy biztosítsuk a megfelelő mintavételezést. A dokkolás többi paraméterét az alapértelmezett értéken hagytuk. Minden egyes ligandumra 100 dokkolást végeztünk.

3.17. Elektrosztatikai számítások

A fehérjemolekula körüli elektrosztatikus potenciált az APBS 1.2.1 program segítségével számoltuk (Baker *et al.*, 2001). A paraméterfájlt az alapértelmezett beállításokkal készítettük a VMD 1.8.7² programhoz tartozó APBS plug-in alkalmazásával

¹<http://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch/>

²<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>

(Humphrey *et al.*, 1996). A numerikus számításához a többszörös Debye-Hückel peremfeltételeket és $T = 298,15$ K hőmérsékletet alkalmaztunk. Az ábrákat a VMD programmal készítettük.

3.18. Statisztikai analízis

Az eredmények legalább 3 mérés átlagát reprezentálják. Az egyes mérések átlagának összehasonlítására Student-féle t-tesztet alkalmaztunk, a különbséget $p < 0,05$ esetén fogadtuk el szignifikánsnak.

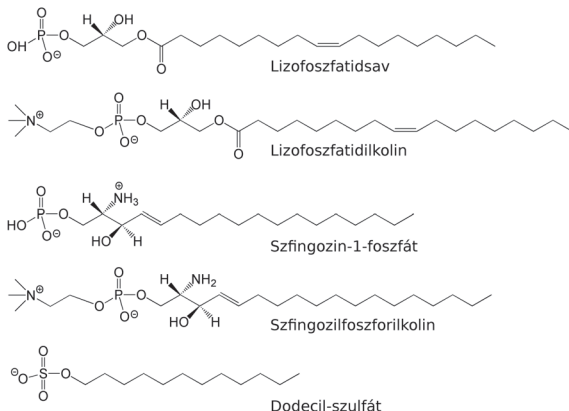
Eredmények és értékelésük

4.1. A β 2m – LPA kölcsönhatás jellemzése

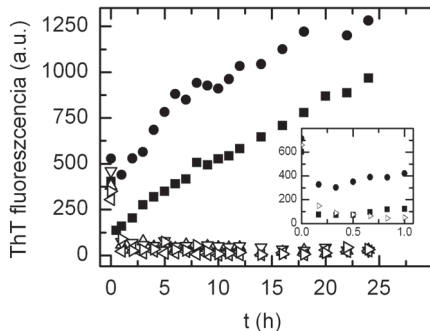
4.1.1. A β 2m amiloidképzésének vizsgálata különböző lipidek jelenlétében

Elsőként azt vizsgáltuk, hogy az LPA és más, hasonló szerkezetű foszfolipidek (LPC, S1P, SPC) milyen hatást fejtenek ki a β 2m amiloidképzésére. A vizsgált lipidek szerkezetét a 4.1. ábra mutatja. A természetben az LPA-nak több fajtája megtalálható, amelyek eltérhetnek egymástól a zsírsavlánc hosszában, illetve telítettségében. A kísérletekben oleoil-LPA-t használtunk, mivel ez reprezentálja leginkább az *in vivo* előforduló LPA-fajták biológiai hatását. A mérés paramétereit (pH, hőmérséklet, ionerősség) úgy választottuk meg, hogy minél jobban hasonlítsanak a fiziológias körülményekhez. Mintáinkban a fehérjekoncentráció 0,1 mg/ml volt, ami megfelel a betegekben mért legmagasabb β 2m koncentrációknak (Koch, 1992; Floege & Ehlerding, 1996). Pozitív kontrollként SDS-t használtunk, erről a vegyületről korábban már leírták, hogy képes hasonló körülmények között a β 2m polimerizációját indukálni (Yamamoto *et al.*, 2004a). Kísérletünkben a lipidek koncentrációja 500 μ M volt, mivel az SDS esetében ennél a koncentrációnál volt megfigyelhető a legnagyobb mértékű szálképződést. Az amiloidképződést alacsony pH-n növesztett szálak szonikálásával előállított magokkal indukáltuk. A β 2m polimerizációját ThT fluoreszcenciás mérésekkel követtük; ez a festék specifikusan kötődik az amiloidszálakhoz, és az ilyenkor mért fluoreszcencia intenzitás arányos a szálak mennyiségével (Naiki *et al.*, 1989).

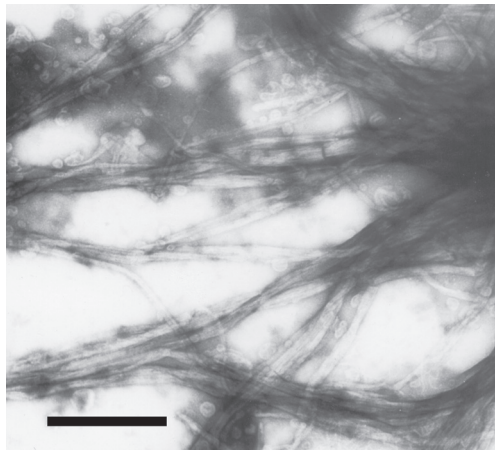
A 4.2. ábrán látható, hogy az SDS és az LPA esetében jelentős ThT fluoreszcencia intenzitás növekedést tapasztaltunk, jelezve az amiloidszálak kialakulását. A többi lipid esetében még több nap elteltével sem figyeltünk meg ilyen jellegű változást. A magok hozzáadása után a fluoreszcencia intenzitás minden esetben csökkent valamennyivel, ami a magok kezdeti depolimerizációját jelzi. Ez a jelenség az SDS esetében volt a legkevésbé kifejezett, ami arra utal, hogy az SDS fejt ki a szálakra a legerősebb stabilizáló hatást.



4.1. ábra. A VIZSGÁLT LIPIDEK SZERKEZETI KÉPLETE.



4.2. ábra. KÜLÖNBÖZŐ LIPIDEK HATÁSA A $\beta 2m$ AMILOIDKÉPZÉSÉRE FIZIOLÓGIAS pH-n. Az amiloidképződést ThT fluoreszcenciás mérésekkel követtük. Az oldatok 0,1 mg/ml $\beta 2m$ -et, valamint 500 μM LPA-t (■), LPC-t (Δ), S1P-t (◄), SPC-t (▽), illetve SDS-t (●) tartalmaztak Na-foszfát pufferben (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4), a szálak képződését 20 μg /ml, pH 2,5-n növesztett szálakból létrehozott maggal indukáltuk. A mintákat 24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, az amiloidképződést ThT fluoreszcenciás mérésekkel követtük. Összehasonlítással a lipidmentes pufferben, azonos körülmények között inkubált fehérje ThT fluoreszcencia intenzitás értékeit is feltüntettük (○). Betét ábra: az első órában bekövetkező ThT fluoreszcencia változások LPA, SDS, valamint a lipidmentes kontroll minta esetében.



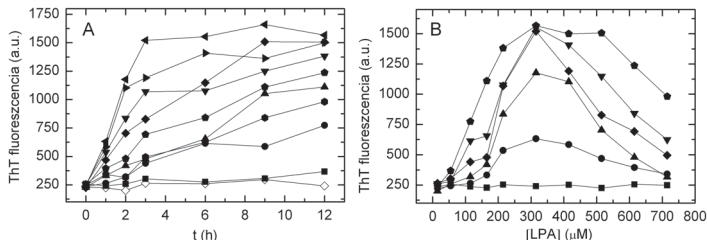
4.3. ábra. LPA JELENLÉTÉBEN LÉTREJÖTT β 2m AMILOIDSZÁLAK ELEKTRONMIKROSKÓPOS KÉPE. A szálatat 1% uranil-acetáttal festettük, majd transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. Lépték: 300 nm.

4.1.2. Az amiloidszálak vizsgálata transzmissziós elektronmikroszkóppal

A különböző lipideket tartalmazó mintákat transzmissziós elektronmikroszkóppal is tanulmányoztuk. Azoknál a mintáknál, amelyek magas ThT fluoreszcencia intenzitást mutattak (LPA, SDS), a vizsgálatok megerősítették az amiloidszálak jelenlétét az oldatokban. Azoknál a mintáknál viszont, amelyeknél nem tapasztaltunk intenzitásnövekedést (LPC, S1P, SPC), nem láttunk szálatat. A 4.3. ábrán LPA jelenlétében növesztett, 12 órás amiloidszálak láthatók.

4.1.3. A β 2m amiloidképzésének függése az LPA koncentrációjától

Ebben a kísérletben arra a kérdésre kerestük a választ, hogy hogyan függ a β 2m amiloidképzése az LPA koncentrációjától. A mérés során 0–700 μ M LPA jelenlétében vizsgáltuk a szálak kialakulását. Korábbi méréseink során azt tapasztaltuk, hogy ha a polimerizációt olyan magokkal indukáljuk, amelyeket fiziológiás pH-n, LPA jelenlétében növesztett szálak szonikálásával állítunk elő, akkor az amiloidképződés sokkal gyorsabb, mintha alacsony pH-n létrehozott szálatat használnánk. Hasonló jelenséget Kihara és munkatársai is megfigyeltek SDS jelenlétében, semleges pH-n



4.4. ábra. β 2m AMILOIDSZÁLAK KELETKEZÉSE FIZIOLÓGIAS pH-N, AZ LPA-KONCENTRÁCIÓ FÜGGVÉNYÉBEN. A minták 0,1 mg/ml β 2m-et, valamint különböző koncentrációjú (0–700 μ M) LPA-t tartalmaztak Na-foszfát pufferben (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4), a szálképződést 10 μ g/ml koncentrációjú, 300 μ M LPA jelenlétében növesztett, az ötödik ciklusból származó magokkal indukáltuk. A mintákat 37 °C-on inkubáltuk, az amiloidképződést ThT fluoreszcenciás mérésekkel követtük. (A) ThT fluoreszcencia intenzitás értékek az idő függvényében 0 μ M (\diamond), 50 μ M (\blacksquare), 100 μ M (\bullet), 150 μ M (\blacktriangle), 200 μ M (\blacktriangledown), 300 μ M (\blacklozenge), 400 μ M (\blacktriangleright), 500 μ M (\blacklozenge), 600 μ M (ötszög) és 700 μ M (hatszög) LPA jelenlétében. (B) ThT fluoreszcencia intenzitás értékek különböző koncentrációjú LPA-t tartalmazó mintáknál 0 h (\blacksquare), 1 h (\bullet), 2 h (\blacktriangle), 3 h (\blacklozenge), 6 h (\blacktriangledown) és 12 h (ötszög) elteltével.

nőtt szálak esetében (Kihara *et al.*, 2005). Ezért ezt a kísérletet, és a továbbiakat olyan magokkal végeztük, amelyeket 300 μ M LPA jelenlétében növesztett, az ötödik ciklusból származó szálakból állítottunk elő.

A 4.4. ábrán látható, hogy az amiloidképződés nagymértékben függ az LPA koncentrációjától. A szálképződés 100 μ M LPA-koncentrációtól fölfelé volt egyértelműen megfigyelhető. A szálak növekedési sebessége 300 μ M LPA jelenlétében volt a legnagyobb, továbbá a ThT fluoreszcencia intenzitás ennél a koncentrációnál érte el a legmagasabb értékeket. Az eredmény akkor is hasonló volt, amikor a kísérlethez 300 μ M-től eltérő koncentrációjú LPA jelenlétében növesztett szálakat használtunk magnak.

4.1.4. A β 2m – LPA kölcsönhatás vizsgálata CD spektroszkópiával

Magok hozzáadása nélkül LPA jelenlétében nem tapasztaltunk szálnövekedést semleges pH-n. Megvizsgáltuk, hogy vajon az LPA ilyenkor okoz-e változást a monomer β 2m szerkezetében. A fehérjét különböző koncentrációjú (0–700 μ M) LPA jelenlétében inkubáltuk, közben CD spektroszkópiával követtük a szerkezeti változásokat. A spektrumokat 5 percenként vettük fel 2 órán keresztül a távoli UV tartományban (200–240 nm), majd 24 óra elteltével még egy további mérést végeztünk.

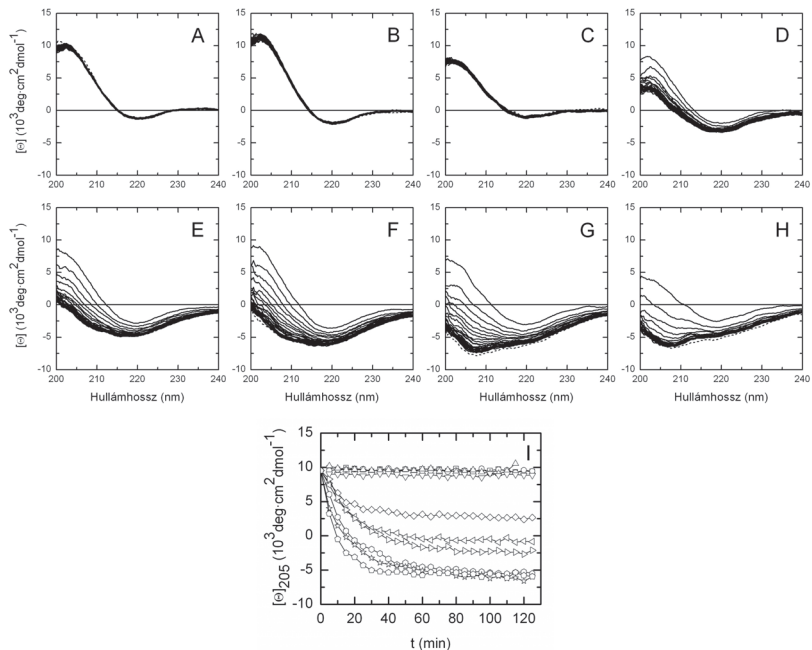
150 μ M LPA-koncentrációtól fölfelé jelentős változásokat figyeltünk meg a CD spektrumokban, ami a natív szerkezet destabilizációjára utal. Ezek a változások annál kifejezettebbek voltak, minél magasabb volt az LPA koncentrációja. Korábbi méréseink során azt tapasztaltuk, hogy az amiloidképződés 300 μ M LPA jelenlétében a leghatékonyabb. Ha ezt összevetjük a CD spektroszkópiás eredményekkel, láthatjuk, hogy ilyen LPA-koncentráció mellett a β 2m részben kitekeredett állapotban van, azaz ez a konformáció hajlamos leginkább az amiloidszálak kialakítására. Az ennél magasabb LPA-koncentrációk már olyan mértékű változásokat okoznak a fehérje szerkezetében, ami kevésbé kedvez a szálképződésnek. A lipidmentes kontroll minta, valamint az 500 μ M LPC jelenlétében inkubált fehérje CD spektrumában nem történt változás (4.5. ábra).

A szerkezeti változások teljesen befejeződtek 1-2 órán belül az LPA koncentrációjától függően, a 2 órás és a 24 órás spektrumok között nem tapasztaltunk lényeges különbséget. A 4.5/I ábrán a 205 nm-nél mért ellipticitásértékek láthatók az idő függvényében, különböző LPA koncentrációk esetén. Látható, hogy minél magasabb volt a lipid koncentrációja, a szerkezeti változások annál hamarabb befejeződtek.

A másodlagos szerkezeti elemek arányát a SELCON3 (Sreerama & Woody, 1993), VARSLC (Manavalan & Johnson, 1987), CDSSTR (Compton & Johnson, 1986), CONTIN (Provencher, 1982), CONTINLL (Provencher & Glöckner, 1981; van Stokkum *et al.*, 1990), és K2D (Andrade *et al.*, 1993) algoritmusok segítségével becsültük meg, az eredményeket a 4.1 táblázat mutatja. Szintén itt láthatók a DSSP program (Kabsch & Sander, 1983) által a Protein Data Bankból származó 2YXF kristályszerkezet (Iwata *et al.*, 2007) alapján a natív fehérjére meghatározott másodlagos szerkezeti elem arányok. Bár a különféle szerkezetjósoló algoritmusok alkalmazása különböző eredményeket hozott, bizonyos tendenciákat minden esetben megfigyelhetünk. 300 μ M LPA jelenlétében a β -redő aránya csökken, valamint megjelenik az α -hélix a szerkezetben. 500 μ M LPA esetében ezek a hatások még kifejezettebben jelentkeznek. A többi szerkezeti elem tekintetében az eredmények nem ennyire egyértelműek, de több algoritmus a rendezetlen szerkezet arányának növekedését mutatja.

4.1.5. A β 2m amiloidszálak vizsgálata CD spektroszkópiával

Az β 2m semleges pH-n történő polimerizációját CD spektroszkópiával is nyomon követtük. A 4.6 ábrán 300 és 500 μ M LPA jelenlétében növesztett amiloidszálak CD spektrumai láthatók. A monomer fehérjét először 2 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk az LPA-val, és csak ezután adtuk hozzá a magokat, majd különböző időtartamok elteltével vettük fel a CD spektrumokat. A magokat a mintáknak megfelelő koncentrációjú (300 illetve 500 μ M) LPA jelenlétében növesztett szálak szonikálá-

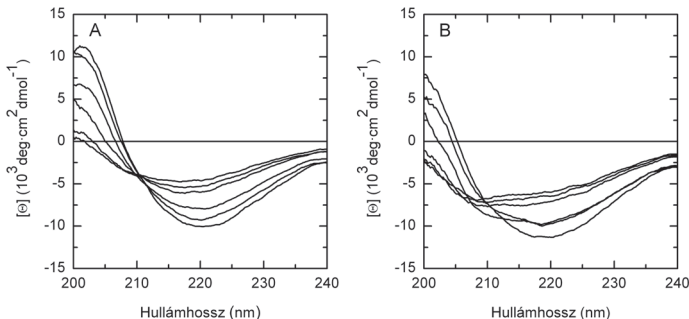


4.5. ábra. A NATÍV, MONOMER $\beta 2m$ SZERKEZETI VÁLTOZÁSAI KÜLÖNBÖZŐ KONCENTRÁCIÓJÚ LPA HATÁSÁRA. 0,1 mg/ml koncentrációjú $\beta 2m$ -et 37°C -on inkubáltunk lipidmentes pufferben (A) vagy 500 μM LPC-vel (B), illetve 150 μM (C), 200 μM (D), 300 μM (E), 400 μM (F), 500 μM (G), és 700 μM (H) LPA jelenlétében. A minták 50 mM Na-foszfátot (pH 7,4) és 100 mM NaCl-t tartalmaztak. A CD spektrumokat 5 percenként vettük fel a távoli UV tartományban 2 órán keresztül, majd 24 óra elteltével még egy további mérést végeztünk (szaggatott vonal). (I) 205 nm-nél mért ellipticitásértékek az LPA-koncentráció és az idő függvényében: 0 μM (\square), 100 μM (\circ), 150 μM (∇), 200 μM (rombusz), 300 μM (\triangleleft), 400 μM (\triangleright), 500 μM (hatszög), 600 μM (csillag), 700 μM (ötszög) LPA, és 500 μM LPC (\triangle).

4.1. táblázat. A MÁSODLAGOS SZERKEZETI ELEMEK ARÁNYA A MONOMER β 2m KÜLÖNBÖZŐ FORMÁINÁL A TÁVOLI UV TARTOMÁNYBAN FELVETT CD SPEKTRUMOK ALAPJÁN.

		Natív	300 μ M LPA	500 μ M LPA
SELCON3 ^a	Hélix	-0,05	0,15	0,20
	β -szál	0,45	0,37	0,32
	Kanyar	0,23	0,19	0,15
	Rendezetlen	0,41	0,23	0,17
VARSLC ^a	Hélix	0,00	0,09	0,12
	β -szál	0,47	0,36	0,31
	Kanyar	0,13	0,20	0,22
	Egyéb	0,41	0,36	0,34
CDSSTR ^b	Hélix	-0,02	0,02	0,04
	β -szál	0,46	0,37	0,35
	Kanyar	0,26	0,23	0,25
	Rendezetlen	0,28	0,37	0,35
CONTIN ^a	Hélix	0,00	0,09	0,08
	β -szál	0,92	0,48	0,40
	Egyéb	0,07	0,43	0,52
CONTINLL ^b	Hélix	0,00	0,03	0,06
	β -szál	0,42	0,28	0,29
	Kanyar	0,25	0,21	0,22
	Rendezetlen	0,03	0,38	0,42
K2D ^c	Hélix	0,02	0,17	0,15
	β -szál	0,51	0,34	0,31
	Random	0,47	0,49	0,54
X-ray ^d	Hélix	0,00
	β -szál	0,48
	Kanyar	0,26
	Egyéb	0,26

Megjegyzés: A másodlagos szerkezeti elemek arányának meghatározására használt programok: a – Dicroprot; b – GlobalWorks; c – K2D; d – DSSP (a 2yxf.pdb kristályszerkezet alapján). A natív fehérje nem tartalmaz α -hélixet; három aminosav 3,10-hélixet alkot. A negatív értékeket $> -0,05$ esetén fogadtuk el, és nullának tekinthetők.



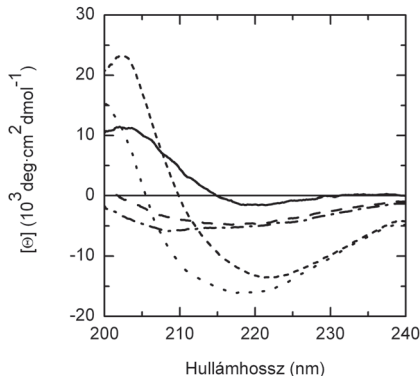
4.6. ábra. LPA HATÁSÁRA LÉTREJÖTT AMILOIDSZÁLAKE TÁVOLI UV TARTOMÁNYBAN FELVETT CD SPEKTRUMA. A minták 0,1 mg/ml $\beta 2m$ -t, valamint 300 μM (A), illetve 500 μM (B) LPA-t tartalmaztak Na-foszfát pufferben (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4), a szálképződést 10 $\mu g/ml$ koncentrációjú, 300 μM LPA jelenlétében növesztett, az ötödik ciklusból származó szálalából létrehozott magokkal indukáltak. A mintákat 37 °C-on inkubáltuk, a CD spektrumokat 0, 1, 4, 20, 30, és 48 h elteltével vettük fel. A magok hozzáadása előtt a monomer fehérjét 2 órán keresztül inkubáltuk a lipid jelenlétében.

sával állítottuk elő. Az első spektrum a fehérje részlegesen rendezetlen szerkezetét mutatja, ami a lipiddel történő inkubálás következménye.

Összhangban a ThT fluoreszcenciás kísérletek eredményeivel, amiloidszálakra jellemző spektrumokat csak LPA és magok együttes jelenlétében tapasztaltunk. Ezeknél a spektrumoknál magas a β -redős szerkezet aránya, minimumuk 221 nm-nél (300 μM LPA), illetve 218 nm-nél (500 μM LPA) található. 300 μM LPA esetében a spektrumok izodikroikus ponttal rendelkeznek 212 nm-nél, ami arra utal, hogy a $\beta 2m$ két különböző konformációs állapotban van jelen az oldatban. 500 μM LPA-nál ilyen pont nem látható. A 4.7. ábra a különböző monomer formák és amiloidszálak spektrumait mutatja.

4.1.6. A $\beta 2m$ – LPA kölcsönhatás vizsgálata ANS fluoreszcenciával

Korábbi eredményeink arra utaltak, hogy a $\beta 2m$ amiloidképzésre leginkább alkalmas állapotában egy részben kitekeredett, molten globula jellegű konformációval rendelkezik, ami az LPA-val való kölcsönhatás eredményeként alakul ki. Hogy ezt a feltételezésünket még inkább alátámasszuk, ANS fluoreszcenciás méréseket végeztünk. Az ANS a molekulák hidrofób felszínéhez kötődik, és ezt fluoreszcens jel növekedése kíséri, ezáltal ez a festék alkalmas a fehérjék fellazult szerkezetének, mol-



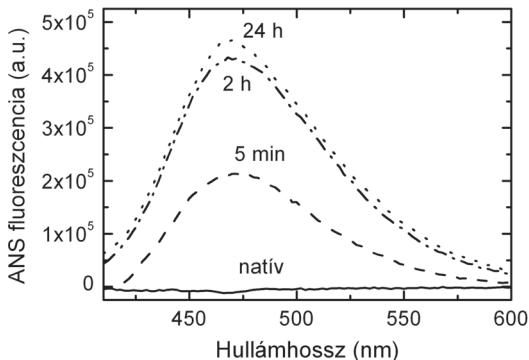
4.7. ábra. A β 2m KÜLÖNBÖZŐ KONFORMÁCIÓJÚ MONOMER ÉS AGGREGÁLT FORMÁINAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA CD SPEKTROSKÓPIÁVAL. A távoli UV tartományban felvett CD spektrumok a következők: natív monomer β 2m (—); monomer β 2m 300 μ M (---) és 500 μ M (-.-) LPA jelenlétében történő, 24 órás inkubáció után; 300 μ M (---) és 500 μ M (···) LPA jelenlétében növesztett, 1 hetes amiloidszálak.

ten globula jellegű konformációjának tanulmányozására (Semisotnov *et al.*, 1991). A kísérletben 300 μ M LPA jelenlétében, illetve anélkül inkubáltuk a fehérjét, és közben követtük az ANS fluoreszcencia változást. Az LPA, mint anionos lipid, kis mértékben képes kötni az ANS-t, ezt a mérés során figyelembe vettük, és a fluoreszcencia intenzitás értékeket ennek megfelelően korrigáltuk.

Mint ezt a 4.8. ábra mutatja, 300 μ M LPA jelenlétében jelentős ANS fluoreszcencia növekedést figyeltünk meg, míg a natív fehérje esetében nem tapasztaltunk ANS fluoreszcenciát. Ez az eredmény, a korábbiakhoz hasonlóan, szintén arra utal, hogy a lipid hatására a fehérje natív szerkezete fellazul, destabilizálódik, és a molekula egy molten globula jellegű konformációt vesz fel. Az ANS fluoreszcencia növekedés időfüggése összhangban volt a CD spektroszkópiás eredményekkel, mivel azt tapasztaltuk, hogy a változás nagyjából 2 órán belül befejeződött, a 2 órás és 24 órás intenzitásértékek között már nem volt jelentős különbség.

4.1.7. A β 2m–LPA kölcsönhatás vizsgálata differenciális pásztázó kalorimetriával

Az LPA hatását a monomer β 2m stabilitására differenciális pásztázó kalorimetriával is megvizsgáltuk. A hődenaturációs kísérletekben a lipid nélkül vizsgált natív

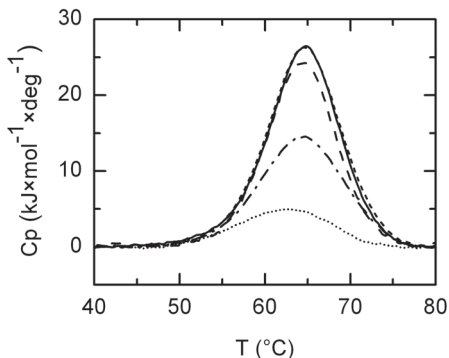


4.8. ábra. Az LPA ÁLTAL DESTABILIZÁLT MONOMER $\beta 2m$ MOLEKULÁK ANS FLUORESZCENCIÁJA. 0,1 mg/ml koncentrációjú monomer $\beta 2m$ -et 5 μM ANS és 300 μM LPA jelenlétében inkubáltunk 37 °C-on, Na-foszfát pufferben (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4). A gerjesztés 380 nm-en történt, az emissziós spektrumokat 5 min (---), 2 h (-.-) és 24 h (...) elteltével detektáltuk. Összehasonlításként a lipidmentes pufferben, azonos körülmények között inkubált natív $\beta 2m$ spektrumát is feltüntettük (—).

fehérje egy kooperatív átmenetet mutatott, melynek T_m értéke 64,6 °C volt (4.9. ábra). 50 μM LPA, illetve 500 μM LPC jelenlétében nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a fehérje hődenaturációjában. 100 és 200 μM LPA jelenlétében a denaturációs csúcs jelentősen csökkent, utóbbi esetben a csökkenés mértéke több, mint 75%-os volt. A T_m értékében nem tapasztaltunk lényeges változást, 200 μM LPA esetében kb. 2 °C csökkenés volt megfigyelhető. Új denaturációs csúcs megjelenését nem tapasztaltuk. A denaturációs csúcs csökkenése a T_m -érték lényeges változása nélkül arra utal, hogy az oldatokban a natív, stabil szerkezetű molekulák száma egyre inkább csökken a növekvő LPA-koncentráció függvényében. Mivel az LPA destabilizálja a $\beta 2m$ szerkezetét, a fellazult szerkezetű fehérjemolekulák már nem mutatnak kooperatív átmenetet, ami a molten globula állapotra jellemző.

4.1.8. A monomer $\beta 2m$ konformációjának hatása az amiloidképződésre

Korábbi méréseink azt mutatták, hogy a $\beta 2m$ -nak egy részben kitekeredett, átmeneti formája hajlamos leginkább az amiloidképzésre, és hogy ez a konformáció nagyjából 300 μM LPA hatására alakul ki. Kíváncsiak voltunk, hogy ha ehhez az átmeneti formához adjuk a magokat és indukáljuk ezzel az amiloidképződést, ez mi-



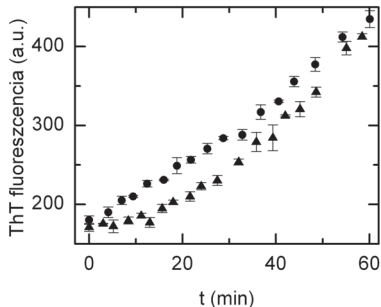
4.9. ábra. A β 2m KALORIMETRIÁS OLVADÁSGÖRBÉJE LPA, ILLETVE LPC JELENLÉTÉBEN. Mintáink 0,1 mg/ml β 2m-et, valamint 0 μ M (—), 50 μ M (---), 100 μ M (···), 200 μ M (— · —) LPA-t, illetve 500 μ M LPC-t (—) tartalmaztak Na-foszfát pufferben (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4), a fűtési sebesség 1 °C/min volt.

lyen hatással van a polimerizációra. A CD spektroszkópiás kísérleteinkből tudjuk, hogy az átmeneti forma kb. 1 órán belül kialakul. Mintáink egy részénél ezért a monomer β 2m-t előinkubáltuk 300 μ M LPA jelenlétében 70 percig, és csak ezután adtuk hozzá a magokat. A többi mintánál a monomer fehérjét és a magokat egyszerre adtuk a lipidoldatokhoz. Mindkét esetben pH 7,4-n növesztett magokat használtunk, a polimerizációt ThT fluoreszcenciás mérésekkel követtük.

A lipiddel előinkubált fehérjét tartalmazó minták esetében azt tapasztaltuk, hogy a polimerizáció azonnal beindult a magok hozzáadása után. A többi mintánál ezzel szemben az első 20 perc folyamán jóval alacsonyabb növekedési sebességet figyeltünk meg. Ezután a polimerizáció itt is felgyorsult, és kb. 1 óra elteltével hasonló ThT fluoreszcencia intenzitás értékeket mértünk az összes mintánál (4.10. ábra). Ezek az eredmények megerősítették azt a feltételezésünket, hogy az amiloidszálak kialakulásához a fehérje részben kitekeredett, átmeneti konformációja szükséges.

4.1.9. Limitált proteolízis

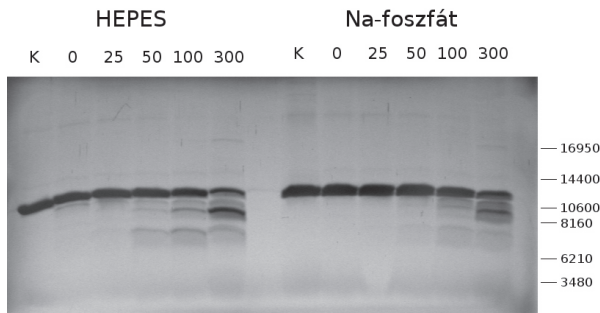
Szerettük volna megtudni, mi az a legalacsonyabb LPA-koncentráció, amely már képes destabilizálni a natív β 2m szerkezetét. Hogy ezt kiderítsük, limitált proteolízis vizsgálatokat folytattunk, mivel ez egy érzékeny módszer a fehérjeszerkezet destabilizációjának kimutatására (Hubbard, 1998). Az emésztést kimotripsinnel



4.10. ábra. A MONOMER $\beta 2m$ KONFORMÁCIÓJÁNAK HATÁSA AZ AMILOIDKÉPZŐDÉSRE. Mintáink 0,1 mg/ml $\beta 2m$ -t és 300 μM LPA-t tartalmaztak Na-foszfát pufferben (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4), a szálképződést 10 $\mu g/ml$ koncentrációjú, 300 μM LPA jelenlétében növesztett, az ötödik cikusból származó magokkal indukáltuk. A minták egy részénél a monomer $\beta 2m$ -t előinkubáltuk 300 μM LPA jelenlétében 70 percig, és csak ezután adtuk hozzá a magokat (●), a többi mintánál a monomer fehérjét és a magokat egyszerre adtuk a lipidoldathoz (▲). A mintákat 37 °C-on inkubáltuk, az amiloidképződést ThT fluoreszcenciás mérésekkel követtük.

végeztük, mert a natív $\beta 2m$ viszonylag ellenálló ezzel az enzimmel szemben. A kimotripszin a fehérjék peptidkötését az aromás és a nagyméretű apoláros oldalláncú aminosavak karboxil oldalán hasítja, ezek az aminosavak főleg a molekula belsejében találhatók a natív szerkezetű globuláris fehérjéknél. Feltételeztük, hogy a kísérleteink során használt Na-foszfát puffer foszfát anionjai versenghetnek az LPA fejcsoportjaival a $\beta 2m$ felszínén található kötőhelyekért, ami azt eredményezheti, hogy a lipid csak magasabb koncentrációnál mutat destabilizáló hatást. Ezt figyelembe véve a limitált proteolízist HEPES pufferben is elvégeztük.

Ahogy ezt korábbi eredményeink alapján vártuk, az LPA jelenlétében történő inkubáció hatására a fehérje szerkezete destabilizálódott, és a lipidkoncentráció függvényében különböző mennyiségű és méretű hasítási termékeket figyelhetünk meg SDS poliakrilamid gélelektroforézis segítségével (4.11. ábra). Na-foszfát pufferben ez a hatás 50 μM LPA-nál jelentkezett, míg HEPES pufferben már 25 μM LPA-nál megjelentek a hasítási termékek. Az LPC-vel végzett kontrollkísérletek során azt tapasztaltuk, hogy ez a lipid semmilyen változást nem okoz a fehérje kimotripszinnel szembeni érzékenységében.

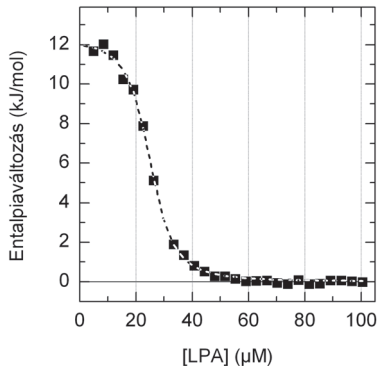


4.11. ábra. A MONOMER β 2m LIMITÁLT PROTEOLÍZISE LPA JELENLÉTÉBEN. 0,2 mg/ml koncentrációjú β 2m-et 1 órán keresztül 37°C -on előinkubáltunk Na-foszfát (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4) vagy HEPES (50 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,4) pufferben, különböző koncentrációjú LPA jelenlétében. Ezután szarvasmarha α -kimotripsinnel limitált proteolízist végeztünk 1:100 enzim:szubsztrát moláris arányban. 30 perc elteltével a reakciót leállítottuk, majd a proteolitikus fragmentumokat SDS poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el. A sávok fölött az LPA koncentrációja látható μM -ban kifejezve, a „K” sáv az emésztés nélküli kontrollt mutatja.

4.1.10. Az LPA kritikus micella koncentrációjának meghatározása ITC-vel

A lizofosfolipidek vizes oldatokban egy adott koncentráció fölött micellákat képeznek. Fontos kérdés, hogy vajon a kísérleteinkben az LPA monomer vagy micella formájában hat kölcsön a β 2m-nal. Hogy ezt eldöntsük, ITC mérésekkel meghatároztuk az LPA kritikus micella koncentrációját (CMC) a többi kísérletünkhöz hasonló körülmények között. A kalorimetriás cella kezdetben csak Na-foszfát puffert tartalmazott, ebbe injektáltuk bele az 1 mM koncentrációjú LPA-oldatot, feltételezve, hogy ez a koncentráció a CMC-érték fölött van.

A CMC-értéknél jóval alacsonyabb koncentrációnál a beinjektált micellák a cellában azonnal szétestek, miközben jelentős mennyiségű hőt vettek fel, ennek az endoterm reakciónak a hőváltozásait detektáltuk. Ahogy a cellában nőtt az LPA koncentrációja, a micellák egyre kisebb mértékben disszociáltak, így egyre kisebb hőváltozások voltak megfigyelhetők. Azt a koncentrációt tekintettük a CMC-értéknek, amelynél az injektálás során tapasztalt hőváltozást kevesebb volt, mint a kiindulási, maximális érték 5%-a. Ez az adott kísérleti körülmények között kb. $50\mu\text{M}$ volt (4.12. ábra). Egy másik, Li és munkatársai által bevezetett definíció szerint a CMC-érték a hőváltozásértékek által meghatározott görbe inflexiós pontja (Li *et al.*, 2004),

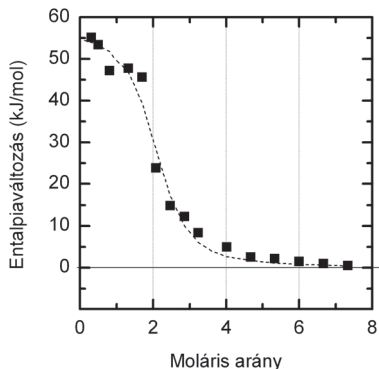


4.12. ábra. Az LPA KRITIKUS MICELLA KONCENTRÁCIÓJÁNAK MEGHATÁROZÁSA ITC-VEL. A Na-foszfát puffert (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4) tartalmazó kalorimetriás cellába 1 mM koncentrációjú LPA oldatot injektáltunk 37°C-on, az ábra a micellák disszociációját kísérő hőváltozásokat mutatja. A kritikus micella koncentrációnak azt a lipidkoncentrációt tekintettük, melynél az injektálást kísérő hőváltozás kevesebb volt, mint a kiindulási, maximális érték 5%-a.

eszerint az LPA CMC-értéke a mi kísérleti körülményeink között kb. 25 μM. Mivel a méréseink során a 25 és 700 μM közötti LPA-koncentráció bizonyult hatékonynak, ez azt jelenti, hogy a kísérleteinkben az LPA micella formájában hat kölcsön a β2m-nal.

4.1.11. A β2m – LPA kölcsönhatás vizsgálata ITC-vel

Szerettünk volna információt nyerni a β2m – LPA kölcsönhatás sztöchiometriájáról és egyensúlyi disszociációs állandójáról, ezért további ITC kísérleteket végeztünk. A kalorimetriás cella 300 μM LPA-t tartalmazott, ebbe injektáltunk 470 μM koncentrációjú monomer β2m oldatot. A titrálás telítési görbét mutatott, melynek alapján a kölcsönhatás sztöchiometriájára az 1:30 β2m – LPA molekula arány jött ki, vagyis egyetlen β2m molekula egy egész „köteg” LPA molekulával hat kölcsön. Ez arra utal, hogy a fehérje a lipid micellákhoz kötődik. Ezt támasztja alá előző mérésünk is, amely azt mutatta, hogy ennél a koncentrációnál a lipid micellák formájában van jelen az oldatban. Tanford munkája alapján (Tanford, 1974) azt feltételeztük, hogy egy LPA micella kb. 60 lipidmolekulából áll, ezért az oldatban a micellakoncentrációt 5 μM-nak becsültük. Így a titrálási görbe alapján az LPA micellák 1:2 arányban voltak telíthetők a monomer β2m molekulákkal. A 4.13. ábrán ábrán a titrálási görbét láthatjuk, a micellákra számolt moláris arány feltüntetésével.

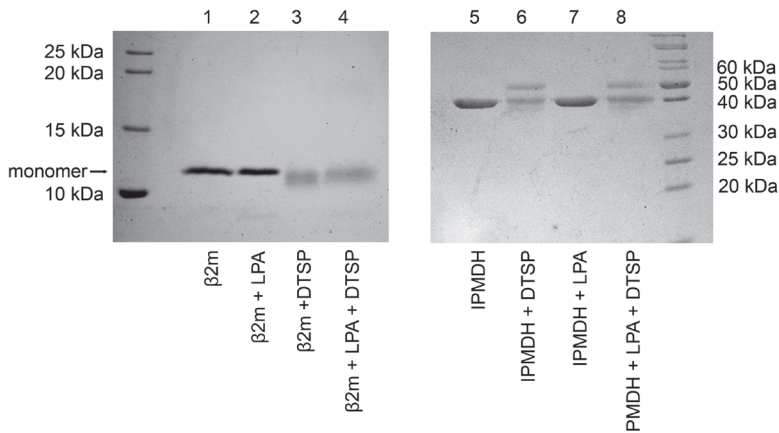


4.13. ábra. A β 2m–LPA KÖLCSÖNHATÁS VIZSGÁLATA ITC-VEL. A kalorimetriás cella 300 μ M LPA-t tartalmazott Na-foszfát pufferben (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4), ebbe injektáltuk bele a 470 μ M koncentrációjú β 2m oldatot 37 °C-on. Ha feltételezzük, hogy egy LPA micella kb. 60 lipidmolekulából áll, az LPA micellák 1:2 arányban telíthetők a monomer β 2m molekulákkal.

Ha megnézzük a β 2m 2YXF kristályszerkezetét (Iwata *et al.*, 2007), láthatjuk, hogy a pozitív oldalláncú aminosavak főleg a fehérje egyik oldalán csoportosulnak. Ennek alapján úgy képzeljük, hogy két β 2m molekula a pozitív felével hozzákötődik a negatív felületű LPA-micellához. A mérés alapján meghatározott egyensúlyi disszociációs állandó 520 ± 200 nM-nak adódott, ami erős kötődésre utal. A reakció során bekövetkező, endoterm jellegű entalpiaváltozás nagysága 54 ± 3 kJ/mol volt. Mivel a β 2m denaturációját kísérő entalpiaváltozás 37 °C-on 175 kJ/mol (Kardos *et al.*, 2004), ez azt jelenti, hogy az LPA-micellákkal való kölcsönhatás jelentős mértékű destabilizációt okoz a fehérjemolekula szerkezetében.

4.1.12. Kémiai keresztkötés

Eredményeink azt mutatták, hogy az LPA hatására a β 2m egy destabilizált, részben kitekeredett konformációt vesz fel. Bizonyos esetekben az ilyen fellazult szerkezetű fehérjemolekulák hajlamosak dimerizálódni vagy oligomerizálódni. Hogy eldöntsük, hogy a fehérje monomer, dimer vagy egyéb oligomer formája vesz-e részt az amiloidképződésben, kémiai keresztkötéses kísérleteket végeztünk. A keresztkötéshez DTSP-t használtunk, ami egy széles körben elterjedt keresztkötő reagens. A DTSP két N-hidroxiszukcinimid (NHS) észtert tartalmaz, amiket egy 12 Å hosszúságú, diszulfidhidat tartalmazó kar köt össze. Működésének lényege, hogy az NHS



4.14. ábra. A MONOMER $\beta 2m$ KÉMIAI KERESZTKÖTÉSE DTSP-VEL $300 \mu M$ LPA JELENLÉTÉBEN. $0,1 \text{ mg/ml}$ koncentrációjú $\beta 2m$ -et 2 órán keresztül előinkubáltuk $300 \mu M$ LPA-val $37^\circ C$ -on Na-foszfát pufferben (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, $pH 7,4$), majd hozzáadtuk a DTSP-t úgy, hogy a $\beta 2m$:DTSP tömegarány 2:1 volt. 1 óra $37^\circ C$ -on történő inkubáció után a reakciót leállítottuk a DTSP-hez képest 50-szeres mennyiségű (mol/mol) glicin hozzáadásával, majd a keresztkötést SDS poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük nem redukáló körülmények között. Pozitív kontrollként *Thermus thermophilus* 3-izopropilmalát dehidrogenáz (IPMDH) enzimet használtunk.

csoportok $pH 7$ és $pH 9$ között képesek a primer aminokkal kovalens kötést kialakítani, és ezáltal stabilizálni a fehérjemolekulák közötti gyenge vagy átmeneti kölcsönhatásokat. A kísérlet során a $\beta 2m$ -t $300 \mu M$ LPA-val előinkubáltuk, majd a mintákhoz adtuk a DTSP-t, és a megfelelő ideig hagytuk hatni a reagenst, hogy stabilizálja az esetlegesen jelen lévő dimereket. Ezután a reakciót leállítottuk, és a mintákat SDS-poliakrilamid gélen, nem redukáló körülmények között megfuttattuk, hogy megnézzük, történt-e keresztkötés.

Mint az a 4.14. ábrán látható, az LPA által destabilizált molekuláknál nem tapasztaltunk dimerizációt. Viszont a DTSP-t tartalmazó mintáknál a monomer $\beta 2m$ sávja kissé elmosódott, mivel a viszonylag nagy mennyiségben alkalmazott keresztkötő reagens valószínűleg többféle keresztkötést kialakított a monomereken belül, némiképp befolyásolva ezzel a fehérjemolekulák elektroforetikus mozgékonyágát. A kísérletekben pozitív kontrollként *Thermus thermophilus* IPMDH-t használtunk, ez egy dimer fehérje, amely két azonos 37 kDa -os alegységből áll. Ennél a fehérjénél

jelentős mértékű keresztkötést figyeltünk meg a két alegység között, függetlenül az LPA jelenlététől vagy hiányától. A gélelektroforézis során a dimerek sávja kissé eltolódott a kétszereshez képest a kisebb molekulatömeg irányába, ezt valószínűleg a keresztkötött molekulák kompakt szerkezete, és emiatt nagyobb elektroforetikus mozgékonyasága okozta. Megállapíthatjuk tehát, hogy a β 2m destabilizált monomer formája vesz részt az amiloidszálak kialakításában.

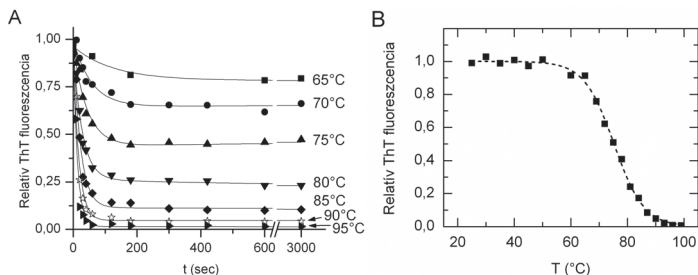
4.1.13. Az LPA hatása a β 2m amiloidszálak stabilitására

Szerettük volna tudni, hogy vajon az LPA van-e valamilyen hatással a már kialakult amiloidszálak stabilitására. Korábban kimutattuk, hogy az alacsony pH-n, Na-citrát pufferben (50 mM Na-citrát, 100 mM NaCl, pH 2,5) növesztett szálak hőkezelés hatására disszociálnak, ami ThT fluoreszcenciás mérésekkel jól nyomon követhető. A disszociáció mértéke függ a hőmérséklettől, 60 °C fölött már megfigyelhető a ThT fluoreszcencia intenzitás csökkenése, 95 °C-on való hőkezelés hatására pedig a szálak teljesen lebomlanak. A disszociáció 1–3 percen belül bekövetkezik az adott hőmérsékleten 0,1 mg/ml koncentrációjú β 2m száloldat esetében, és innentől kezdve már nem változnak a ThT fluoreszcencia intenzitás értékek, még 50 perc elteltével sem (4.15 ábra). A kísérletekből az is kiderült, hogy a disszociációt nagymértékben befolyásolja a különböző adalékanyagok jelenléte. Ha a puffer nem tartalmazott NaCl-t, az a szálak stabilitásának csökkenését okozta. 10% glicerol jelenléte gyakorlatilag semmilyen hatással nem volt a szálak magas hőmérsékleten bekövetkező disszociációjára. 2 mM Na-szulfát nagymértékben növelte a szálak stabilitását, 500 μ M SDS pedig teljesen megvédte a szálakat hőkezelés okozta depolimerizációtól (4.16. ábra).

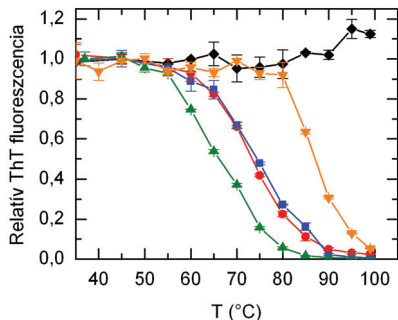
A fenti megfigyelések lehetővé teszik, hogy gyorsan és egyszerűen megvizsgáljuk egy adott vegyületnek az amiloidszálak stabilitására kifejtett hatását. A jelen kísérletben pH 2,5-n létrehozott amiloidszálakat 0,1 mg/ml koncentrációban felfuszpendáltunk olyan Na-citrát pufferben, amely 500 μ M koncentrációban tartalmazott valamilyen adalékanyagot (SDS, LPA, LPC vagy SPC), és az így kapott adatokat különböző hőmérsékleteken 5 percig hőkezeltük. A disszociáció mértékét ThT fluoreszcenciás mérésekkel vizsgáltuk. A 4.17. ábrán látható, hogy az LPA, hasonlóan az SDS-hez, megvédte az amiloidszálakat a hőkezelés hatására bekövetkező disszociációtól. Az LPC-nek és az SPC-nek ezzel szemben semmilyen hatása nem volt, a szálak a lipidmentes mintához hasonló módon lebomlottak.

4.1.14. Az eredmények értékelése

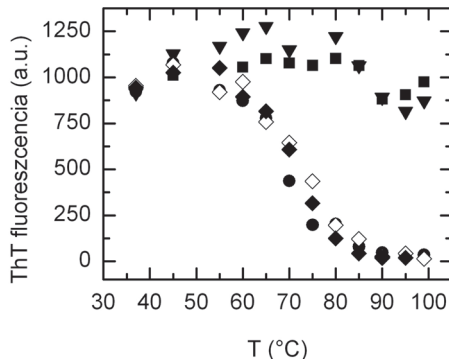
Munkánk során azt vizsgáltuk, hogy az LPA milyen hatással van a β 2m fiziológias pH-n történő amiloidképzésére, a natív, monomer β 2m szerkezetére, valamint az



4.15. ábra. $\beta 2m$ AMILOIDSZÁLAK DISSZOCIÁCIÓJA HŐKEZELÉS HATÁSÁRA. (A) pH 2,5-n nött, 0,1 mg/ml koncentrációjú amiloidszálakat különböző hőmérsékleteken inkubáltunk, a szálak disszociációját ThT fluoreszcenciás mérésekkel követtük. (B) A szálakat 5 percig inkubáltuk különböző hőmérsékleteken, majd ThT fluoreszcenciával vizsgáltuk a megmaradt szálak mennyiségét.



4.16. ábra. KÜLÖNBÖZŐ VEGYÜLETEK HATÁSA A $\beta 2m$ AMILOIDSZÁLAK STABILITÁSÁRA. pH 2,5-n nött, 0,1 mg/ml koncentrációjú amiloidszálakat 5 percig inkubáltunk különböző hőmérsékleteken, különböző adalékanyagok jelenlétében, majd ThT fluoreszcenciás mérésekkel vizsgáltuk a megmaradt szálak mennyiségét. Kék: adalékanyag-mentes, kontroll minta (50 mM citrát, 100 mM NaCl, pH 2,5), zöld: NaCl-mentes minta, piros: 10% glicerol, narancssárga: 2 mM Na-szulfát, fekete: 500 μ M SDS.



4.17. ábra. Az LPA HATÁSA A β 2m AMILOIDSZÁLAK STABILITÁSÁRA. pH 2,5-n növelt, 0,1 mg/ml koncentrációjú amiloidszálakat 5 percig inkubáltunk különböző hőmérsékleteken SDS (▼), LPA (■), LPC (●) vagy SPC (◆) jelenlétében, majd ThT fluoreszcenciás mérésekkel vizsgáltuk a megmaradt szálak mennyiségét. Összehasonlításként a lipidmentes kontroll minta depolimerizációját is feltüntettük (◇).

amiloidszálak stabilitására. A fenti kísérletek számos fontos információt nyújtottak a β 2m – LPA kölcsönhatás mechanizmusáról.

Elsőként arra voltunk kíváncsiak, hogy az LPA milyen hatást fejt ki a β 2m aggregációjára fiziológiásnak megfelelő pH, ionerősség, hőmérséklet, valamint a DRA-s betegek vérében mérhető β 2m-koncentráció esetén. Eredményeink azt mutatják, hogy az LPA képes kiváltani a β 2m amiloidképzését a fenti körülmények között, a szálak szonikálásával előállított amiloid magok jelenlétében. A szálak kialakulását ThT fluoreszcenciával, CD spektroszkópiával és transzmissziós elektronmikroszkópiával is detektáltuk. A kölcsönhatás specifikusnak bizonyult, mivel a többi általunk vizsgált lizofosfolipid (az LPC, az S1P, és az SPC) nem váltott ki hasonló hatást. Az amiloidképződés mértéke összefüggést mutatott az LPA koncentrációjával. Leghatékonyabbnak a 300 μ M körüli LPA-koncentráció bizonyult, de már 100 μ M LPA-koncentrációtól fölfelé sikerült egyértelműen detektálni a szálképződést ThT fluoreszcenciás mérések segítségével. Kísérleteinkben 300 μ M jelenlétében a végső ThT fluoreszcencia intenzitás értékek hasonlóak voltak, mint a pH 2,5-n történő amiloidképződés esetén. Ez arra utal, hogy a polimerizáció befejeződésekor szinte az összes β 2m molekula amiloidszálak formájában volt jelen az oldatban, mivel a fent említett, alacsony pH-n bekövetkező amiloidképződés végére a monomer fehérje koncentrációja hozzávetőlegesen a kiindulási érték 1%-ára csökkent (Kardos *et al.*,

2004). Megfigyeltük továbbá, hogy az LPA által indukált amiloidképződés szignifikánsan gyorsabb volt, ha fiziológiás pH-n, LPA jelenlétében növesztett száalából létrehozott magokat használtunk az alacsony pH-n nött száal helyett. Ezen kívül az alacsony pH-n létrehozott magok először jelentős mértékű depolimerizációt mutattak, mikor a fiziológiás pH-jú β 2m monomer oldathoz adtuk őket, és csak ezután indult meg az új száalak kialakulása LPA jelenlétében. Ilyesmit a pH 7,4-n előállított magok esetében nem tapasztaltunk. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az LPA jelenlétében képződött amiloidszáalak szerkezete eltér a pH 2,5-n nött száalakétól.

Amiloidmagok nélkül az LPA nem indukálta a β 2m amiloidképzését fiziológiás körülmények között a kísérleteink időtartama (maximum 1 hét) alatt, viszont destabilizálta a fehérje natív szerkezetét. CD spektroszkópiás vizsgálataink alapján a destabilizáció annál nagyobb mértékű volt, minél magasabb LPA-koncentrációt alkalmaztunk. A CD spektrumok részletes elemzése azt mutatta, hogy a lipidkoncentráció növekedésével egyre inkább csökken a β -redős szerkezet aránya a molekulában. A polimerizációs kísérleteink azt mutatták, hogy az amiloidképződés 300 μ M LPA jelenlétében a leghatékonyabb. CD spektroszkópiás vizsgálataink alapján a fehérje ilyen lipidkoncentráció mellett egy részben kitekeredett konformációt vesz fel, így arra következtettünk, hogy ez a konformáció hajlamos leginkább az amiloidszáalak kialakítására. Az ennél magasabb LPA-koncentrációk már olyan mértékben destabilizálják a fehérjemolekulák szerkezetét, hogy az már kevésbé kedvező a száalak kialakítása szempontjából. Ha CD spektroszkópiával nyomon követjük a száalak kialakulását 300 μ M LPA jelenlétében, láthatjuk, hogy a spektrumok izodikroikus ponttal rendelkeznek. Ez arra utal, hogy a β 2m két különböző konformációs állapotban van jelen az oldatban – részben kitekeredett, amiloidképzésre hajlamos monomerek, illetve amiloidszáalak formájában. 500 μ M LPA-koncentrációnál izodikroikus pont nem látható, tehát a fehérje itt kettőnél többféle konformációban van jelen, azaz megjelennek az amiloidképzés szempontjából kevésbé kedvező, nagyobb mértékben kitekeredett fehérjemolekulák.

A feltevésünket, miszerint az amiloidképzésre leginkább a fehérje egy részben kitekeredett formája hajlamos, további módszerekkel is alátámasztottuk. ANS fluoreszcenciás vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a fehérje 300 μ M LPA jelenlétében egy fellazult, molten globula jellegű konformációt vesz fel. DSC-vel végzett vizsgálataink szintén azt mutatták, hogy az LPA hatására a β 2m szerkezete destabilizálódik, és a fellazult szerkezetű fehérjemolekulák már nem mutatnak kooperatív átmenetet a hődenaturáció során. Továbbá, ha a fehérjét 300 μ M LPA-val 1 órán keresztül előinkubáltuk, és csak ezután indukáltuk az amiloidképződést magok hozzáadásával, a polimerizáció azonnal megindult, míg ha a monomer fehérjét a magokkal együtt adtuk az LPA-oldathoz, a száalnövekedés sebessége sokkal alacsonyabb volt az első

20 perc folyamán. Ez is arra utal, hogy a részben kitekeredett forma szükséges az amiloidképződéshez, míg a natív fehérje nem képes a szálak kialakítására.

A részben kitekeredett konformáció szerepét az amiloidképződésben már többen leírták (McParland *et al.*, 2000; Chiti *et al.*, 2001; Horwich, 2002; Uversky & Fink, 2004; Kameda *et al.*, 2005; Eakin *et al.*, 2006; Jahn *et al.*, 2006; Skora *et al.*, 2010). Ebből a szempontból az LPA, az SDS és a TFE hatásmechanizmusa hasonlóan tekinthető, hiszen mindhárom vegyület olyan koncentrációban indukálja leginkább a β 2m amiloidképzését, amelynek hatására a fehérje egy részben kitekeredett konformációt vesz fel (Yamamoto *et al.*, 2004 a; Yamamoto *et al.*, 2004 b; Yamaguchi *et al.*, 2006; Rennella *et al.*, 2010). A TFE esetében ez a koncentráció szignifikánsan magasabb, mint a másik két vegyületnél, mivel a TFE az oldószer tulajdonságainak megváltoztatásával, illetve a hidrogénkötések és hidrofób kölcsönhatások befolyásolásával fejti ki hatását. A Cu^{2+} -ionok viszont, a fenti vegyületektől eltérően, nem okoznak jelentős változásokat a β 2m natív szerkezetében, viszont csökkentik a fehérjemolekulák stabilitását, mint az hő- és ureadenaturációs kísérletekből kiderült (Morgan *et al.*, 2001; Villanueva *et al.*, 2004).

Miután többféle módszerrel is kimutattuk, hogy az LPA destabilizálja a β 2m natív szerkezetét, szerettük volna tudni, melyik az a legalacsonyabb LPA koncentráció, amely már képes ezt a hatást kiváltani. Ezért kimotripsinnel limitált proteolízises kísérleteket végeztünk, mivel ez a módszer érzékeny a fehérjeszerkezet destabilizációjára. A vizsgálatok alapján Na-foszfát pufferben $50\text{ }\mu\text{M}$ körüli LPA koncentráció esetén jelentek meg új proteolitikus fragmentumok az emésztés során, míg HEPES pufferben, ahol a foszfát anionok nem befolyásolták a kölcsönhatást, már $25\text{ }\mu\text{M}$ LPA jelenlétében megfigyeltük a β 2m destabilizációját.

A natív β 2m fiziológias körülmények között monomer formában van jelen, mint ezt korábban leírták analitikai ultracentrifugás vizsgálatok alapján (McParland *et al.*, 2000). Viszont, mint ezt láthattuk korábbi kísérleteinknél, az LPA destabilizálja a β 2m szerkezetét, a fellazult szerkezetű fehérjemolekulák pedig bizonyos esetekben hajlamosak dimerizálódni. Antwi és munkatársai például leírták, hogy Cu^{2+} -ionok jelenlétében a β 2m monomerekből először dimerek, majd tetramerek keletkeznek. Ezek a tetramerek azután szerkezeti átrendeződésen mennek keresztül, majd a Cu^{2+} -ionok leválnak róluk, végül ezek a Cu^{2+} -ion-mentes tetramerek vesznek részt az amiloidszálak kialakításában (Antwi *et al.*, 2008). Így felmerült annak a lehetősége, hogy talán LPA esetében sem a monomer fehérjemolekulák, hanem azok dimer, vagy esetleg egyéb oligomer alakjai hajlamosak a szálképzésre. Hogy ezt a kérdést tisztázzuk, kémiai keresztkötéses vizsgálatokat végeztünk az LPA által destabilizált β 2m-nal. Az eredmények azt mutatták, hogy a fellazult szerkezetű fehérje továbbra is monomer formában van jelen, tehát LPA esetében a monomer fehérjemolekulák

vesznek részt az amiloidszálak kialakításában.

Mivel a lizofoszfolipidek vizes oldatokban egy adott koncentráció fölött micellákat képeznek, fontos kérdés volt, hogy vajon a kísérleteinkben az LPA monomer vagy micella formájában hat kölcsön a β 2m-nal. ITC vizsgálatok alapján az LPA kritikus micella koncentrációja 25-50 μ M közötti tartományba esik a kísérleti körülményeink között. Ez azt jelenti, hogy kísérleteinkben, amelyekben az amiloidképződésre legkedvezőbb LPA-koncentrációnak a 300 μ M bizonyult, az LPA micella formájában vesz részt a kölcsönhatásban. Ebben a tekintetben az LPA különbözik az SDS-től, mivel az a CMC-érték alatti koncentrációkban fejt ki amiloidogén hatását (Yamamoto *et al.*, 2004a). Ez tovább erősíti azt a feltételezésünket, hogy az LPA és az SDS eltérő módon segíti elő a β 2m amiloidképzését. Erre utalt korábban az a megfigyelés is, hogy a pH 2,5-n nött szálaból létrehozott magok sokkal kevésbé disszociálnak fiziológias pH-n SDS jelenlétében, összevetve az LPA-val.

ITC vizsgálatok segítségével a β 2m–LPA kölcsönhatás sztöchiometriájáról is információkat nyertünk. Az eredmények azt mutatták, hogy az LPA-micellák 1:2 arányban telíthetők a monomer β 2m molekulákkal, feltételezve, hogy egy LPA-micella kb. 60 lipidmolekulából áll. A mérések alapján a kölcsönhatás egyensúlyi disszociációs állandója 520 ± 200 nM-nak adódott, ami erős kötődésre utal.

Végül megvizsgáltuk, hogy az LPA milyen hatással van a már kialakult amiloidszálak stabilitására. Felhasználva korábbi megfigyelésünket, hogy a pH 2,5-n nött amiloidszálak magas hőmérsékleten történő kezelés hatására monomerekké disszociálnak, hődenaturációs kísérleteket végeztünk, melyek során a szálatokat különböző hőmérsékleteken inkubáltuk különböző adalékanyagok jelenlétében. A kísérletek igazolták, hogy az LPA, hasonlóan az SDS-hez, képes stabilizálni a szálatokat, és megvédi őket a magas hőmérséklet által okozott depolimerizációtól. Ez a hatás specifikusnak bizonyult, mivel a többi vizsgált lipid (az LPC és az SPC) jelenléte nem befolyásolta a szálatok stabilitását.

Összefoglalva a kapott eredményeket elmondhatjuk, hogy az LPA kétféleképpen fejt ki hatását a β 2m amiloidképzésére. Egyfelől destabilizálja a natív, monomer β 2m molekulákat, létrehozva egy részben kitekeredett konformációt, és ez a forma hajlamos az amiloidszálak kialakítására. Másrészt az LPA a már meglévő szálatokat is stabilizálja, megvédvé őket a disszociációtól.

4.2. Az LPA és az SDS fontosabb kötőhelyei a β 2m felszínén

4.2.1. A potenciális kötőhelyek meghatározása *in silico* dokkolással

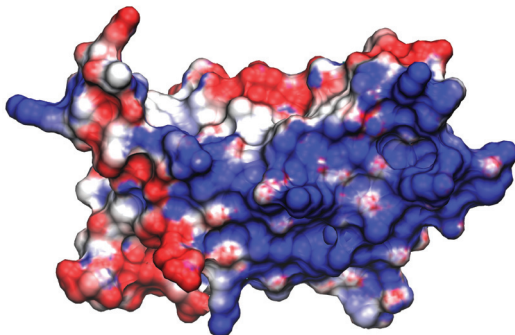
A továbbiakban azt tűztük ki célul, hogy meghatározzuk az LPA legfontosabb kötőhelyeit a β 2m felszínén. A vizsgálatokat SDS-re is kiterjesztettük, mivel ez a vegyület az LPA szerkezeti analógiájának tekinthető. Elsőként *in silico* dokkolási kísérleteket végeztünk, amelyhez az AutoDock szoftvert használtuk. Az egyes ligandummolekulákat vegyületenként 100 alkalommal dokkoltuk a fehérje felszínére, majd az így kapott kötődési mintázat alapján elkészítettük az egyes molekulákra vonatkozó sűrűségterképet, és meghatároztuk a potenciális kötőhelyeket.

A dokkolás során a ligandumok fejcsoportjai változó mértékű klaszterizációt mutattak, míg az apoláris láncok általában a fehérjefelszín valamelyik árkába illeszkedtek. A fejcsoportok mind az SDS, mind az LPA esetében nagyrészt a fehérje felszínének az N-terminálison lévő β -szál felőli oldalához kötődtek. Ha megvizsgáljuk a töltések eloszlását a β 2m felszínén, láthatjuk, hogy az N-terminális szakasz közelében főleg pozitív töltésű oldalláncok találhatók nagyobb mennyiségben, míg az ellenkező oldalon főleg negatívak, így a fehérjemolekula jól látható dipólusmomentummal rendelkezik (4.18. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy az SDS és LPA valószínűleg elektrosztatikus kölcsönhatással kötődik a fehérje felszínéhez, amelyben a ligandummolekulák negatív fejcsoportjai, valamint a fehérjefelszín pozitív lizin, illetve arginin oldalláncjai vesznek részt.

Az SDS esetében az eredmények egy specifikus kötőhely jelenlétére utaltak az N-terminális közelében, mivel 100 dokkolási kísérletből 38 esetben ugyanarra a területre kötődött az SDS molekula. Az LPA esetében a kötődés kevésbé volt specifikus és a fejcsoportok eloszlása szórta volt, de a kötőhely az N-terminális közelében itt is jól megfigyelhető volt (4.19. ábra). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az N-terminális fontos szerepet játszik a fehérje SDS és LPA által történő destabilizációjában. A kötésben fontos pozitív töltésű oldalláncnak a K6 és R12 adódtak.

Azoknál a ligandummolekuláknál, amelyek a kísérletekben nem váltották ki a β 2m natív szerkezetének destabilizációját (LPC, S1P, SPC), nem találtunk specifikus kötőhelyeket, a fejcsoportok szinte egyenletesen kötődtek a fehérjemolekula felszínére (4.20. ábra).

Meg kell jegyeznünk, hogy a dokkolási kísérletekben csak a monomer SDS és lipidmolekulák kötődését tudtuk vizsgálni, a micellákat nem. A micellák kötődésére is érvényes a dokkolási kísérlet annyiban, hogy valószínűsíti a fejcsoportok lehetséges kötődési helyeit, amelyek a micella külsején helyezkednek el.



4.18. ábra. A $\beta 2m$ FELSZÍNI ELEKTROSZTATIKUS POTENCIÁLTÉRKÉPE. Fehérrel a neutrális területeket, kékkel a pozitív, pirossal a negatív töltéseket jelöltük.

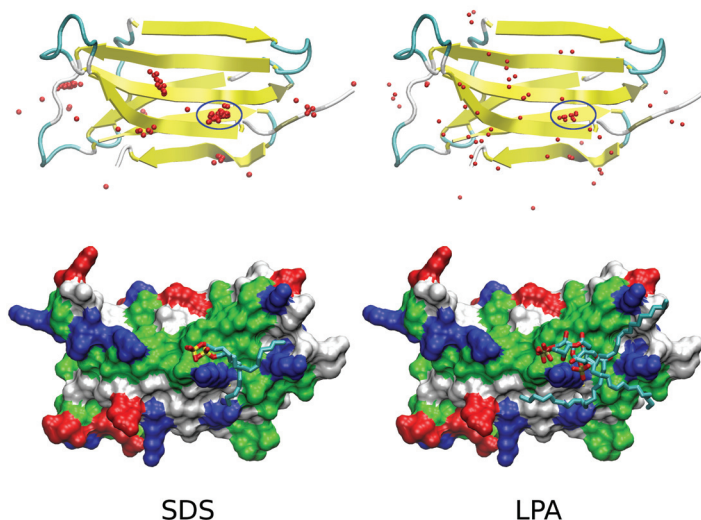
4.2.2. Irányított mutagenézis

Következő lépésként azt szeretnénk volna tudni, melyek azok az oldalláncok, amelyek részt vesznek a $\beta 2m$ –LPA és a $\beta 2m$ –SDS kölcsönhatásban. Ezért az *in silico* dokkolás eredményeit alapul véve egyes lizin és arginin aminosavakat alaninra cseréltünk, majd megvizsgáltuk, hogy a mutációk milyen hatással vannak a fehérje SDS, illetve LPA hatására bekövetkező amiloidképzésére (4.21. ábra).

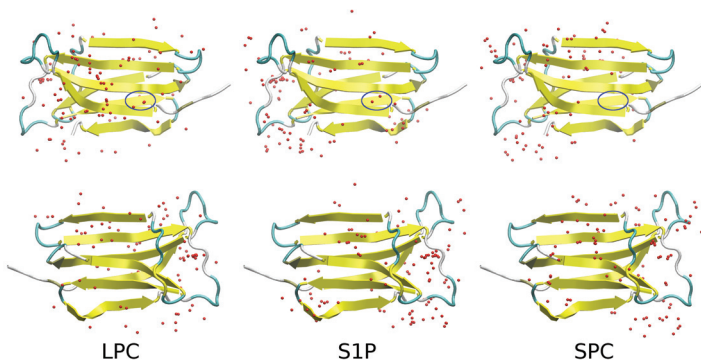
A dokkolási eredmények alapján feltételeztük, hogy a K6 fontos szerepet játszhat az SDS és az LPA kötésében is. Továbbá az $\beta 2m$ –SDS kölcsönhatásban az R12 oldallánc szerepe is valószínűnek látszott. Kontrollként a K19-et választottuk, ennek az aminosavnak a közelében nem találtunk specifikus kötőhelyet a dokkolási kísérletek során, ezen kívül egy hurok régióban helyezkedik el, így feltehetően nincs jelentős szerepe a fehérjeszerkezet stabilizálásában. Mivel a mutáns fehérjék CD spektrumában nem láttunk különbséget a vad típusú fehérjéhez képest, feltételeztük, hogy a mutációk nem okoztak változást a fehérjemolekulák natív szerkezetében.

4.2.3. A $\beta 2m$ variánsok amiloidképzésének vizsgálata ThT fluoreszcenciával

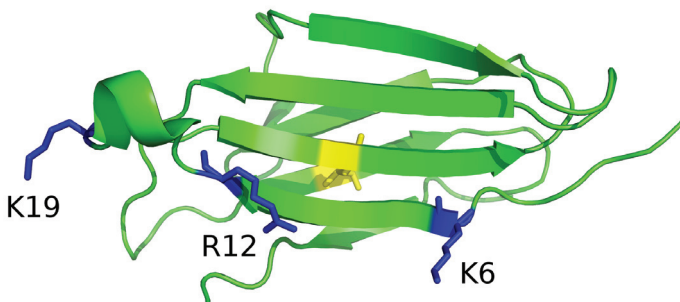
A $\beta 2m$ variánsok SDS és LPA jelenlétében történő amiloidképzését ThT fluoreszcenciás mérésekkel vizsgáltuk. A kísérletekben $500\mu M$ SDS-t és $300\mu M$ LPA-t



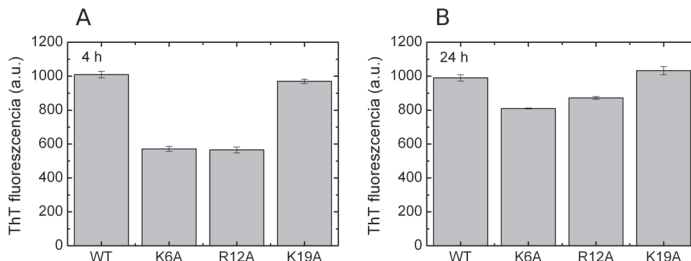
4.19. ábra. Az LPA és az SDS dokkolása a $\beta 2m$ felszínén. A felső ábrákon a piros pontok a fejcsoportok kötődését mutatják, 100 dokkolás eredményét tüntettük fel. Az N-terminális közelében található kötőhelyet késsel bekarikázva jelöltük. Az alsó ábrákon a $\beta 2m$ térkitöltéses modellje látható a ligandummolekulák jellemző konformációival, a szénhidrátlánccok általában a fehérje valamelyik felszíni árkába illeszkedtek. A különféle típusú aminosavakat különböző színekkel jelöltük (piros: negatív; kék: pozitív; zöld: töltéssel nem rendelkező, poláros; fehér: hidrofób).



4.20. ábra. Az LPC, az S1P és az SPC dokkolása a $\beta 2m$ felszínén. A fejcsoportok kötődését piros pontok jelzik. Az SDS-nél és LPA-nál megfigyelt, N-terminális közeli kötőhelyet itt is bekarikáztuk. Az ábrapárokból a felső az N-terminális régió felőli nézet, az alsó pedig az ezzel ellentétes.



4.21. ábra. A $\beta 2m$ IRÁNYÍTOTT MUTAGENEZISE. Kék színnel jelöltük a mutagenézis során alaninra cserélt lizin, illetve arginin aminosavakat.



4.22. ábra. A β 2m VARIÁNSOK AMILOIDKÉPZÉSE 500 μ M SDS JELENLÉTÉBEN.

A minták 0,1 mg/ml β 2m-et, valamint 500 μ M SDS-t tartalmaztak Na-foszfát pufferben (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4), a szálképződést 20 μ g/ml, pH 2,5-n növesztett szálakból létrehozott maggal indukáltuk. A mintákat 37 °C-on inkubáltuk, az amiloidképződést ThT fluoreszcenciás mérésekkel követtük. Az eredményeket átlag \pm szórás formában adtuk meg.

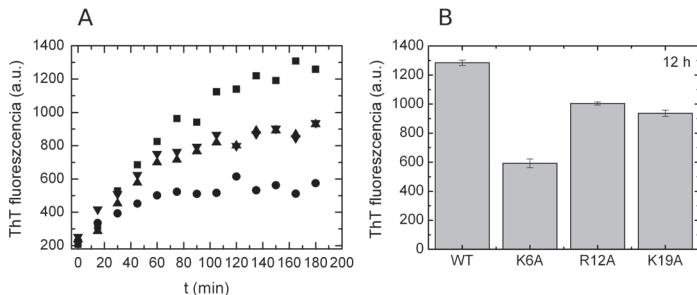
alkalmaztunk, mivel a korábbi eredményeink, illetve irodalmi adatok alapján ezek a koncentrációk bizonyultak a leghatékonyabbnak (Yamamoto *et al.*, 2004a).

500 μ M SDS esetében mind a K6A, mind az R12A variáns jóval kisebb mértékű amiloidképződést mutatott a vad típusú fehérjéhez képest 4 óra elteltével, míg a K19A ThT fluoreszcencia intenzitás értékei a vad típuséhoz voltak hasonlóak. 24 óra elteltével a különbségek csökkentek a variánsok között, de a K6A és az R12A intenzitásértékei továbbra is szignifikánsan kisebbek voltak a két kontroll fehérjéhez viszonyítva (4.22. ábra). 48 óra elteltével nem történt jelentős változás a 24 órás adatokhoz képest.

300 μ M LPA esetében a K6A mutatta a legalacsonyabb növekedési sebességet, és a végső intenzitásértékek is ennél a variánsnál voltak a legalacsonyabbak. Az R12A és K19A variánsok esetében az amiloidképződés mértéke kisebb volt, mint a vad típusnál, de nagyobb, mint a K6A esetében. A szálnövekedés az összes variáns esetében kb. 3 óra alatt befejeződött, a 3 órás és a 24 órás adatok között már nem volt jelentős különbség (4.23. ábra).

4.2.4. A β 2m variánsok szerkezeti változásainak vizsgálata CD spektroszkópiával

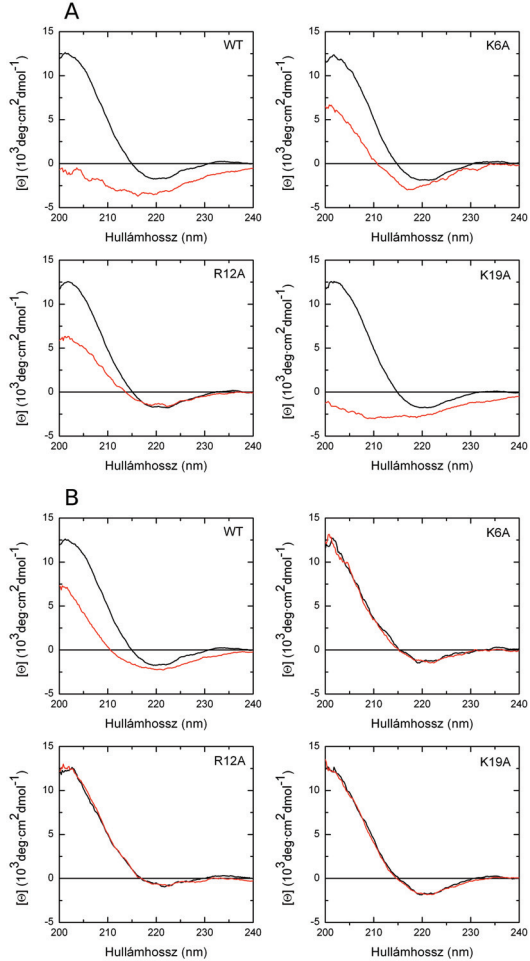
A β 2m variánsok SDS és LPA hatására történő szerkezeti változásait CD spektroszkópiával tanulmányoztuk. A monomer fehérjét 500 μ M SDS-t és 300 μ M LPA jelenlétében inkubáltuk, a spektrumokat 90 percen keresztül, 5 percenként vettük fel a távoli UV tartományban (200–240 nm).



4.23. ábra. A $\beta 2m$ VARIÁNSOK AMILOIDKÉPZÉSE $300 \mu M$ LPA JELENLÉTÉBEN. A minták $0,1 \text{ mg/ml}$ $\beta 2m$ -et, valamint $300 \mu M$ LPA-t tartalmaztak Na-foszfát pufferben (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, $\text{pH } 7,4$), a szálképződést $10 \mu\text{g/ml}$ koncentrációjú, $300 \mu M$ LPA jelenlétében növesztett, az ötödik ciklusból származó magokkal indukáltuk. A mintákat 37°C -on inkubáltuk, az amiloidképződést ThT fluoreszcenciás mérésekkel követtük. Az (A) ábrán az egyes variánsokat jelölő szimbólumok a következők: vad típus (■), K6 (●), R12 (▲), K19 (▼). A (B) ábrán az eredményeket átlag \pm szórás formában adtuk meg.

Az eredmények jó összhangot mutattak a ThT fluoreszcenciás mérésekkel. $500 \mu M$ SDS jelenlétében a vad típusú fehérje és az R19A variáns CD spektrumában jelentős változások voltak megfigyelhetők, jelezve a natív szerkezet destabilizációját. A K6A és az R12A variánsok esetében ezzel szemben csak kismértékű szerkezeti destabilizáció történt (4.24/A ábra). $300 \mu M$ LPA jelenlétében kizárólag a vad típusú fehérje CD spektrumában figyelhetünk meg változást. A K6A, R12A és K19A variánsok CD spektruma 90 perc elteltével is hasonló volt a natív fehérje spektrumához (4.24/B ábra).

A három mutáns fehérje $300 \mu M$ LPA hatására történő destabilizációjában CD spektroszkópiával nem tudtunk különbséget kimutatni, annak ellenére, hogy a ThT fluoreszcenciás mérések alapján a három variáns amiloidképzése eltérő mértékű volt $300 \mu M$ LPA jelenlétében. Ez a CD spektroszkópia kisebb érzékenységeivel magyarázható. Hasonló jelenséget korábban is megfigyeltünk, amikor a vad típusú fehérje CD spektrumában nem tapasztaltunk változást $100 \mu M$ LPA jelenlétében, annak ellenére, hogy ennél az LPA-koncentrációnál már jól megfigyelhető volt a szálképződés ThT fluoreszcenciás mérések alapján.



4.24. ábra. A β 2m VARIÁNSOK SZERKEZETI VÁLTOZÁSAI SDS ÉS LPA JELENLÉTÉBEN. A 0,1 mg/ml koncentrációjú monomer fehérjéket 37 °C-on inkubáltuk Na-foszfát pufferben (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4), 500 μ M SDS (**A**) vagy 300 μ M LPA (**B**) jelenlétében, a szerkezeti változásokat CD spektroszkópiával vizsgáltuk. Az ábrákon a fehérjék 90 perc után felvett CD spektruma látható (piros), referenciaként a natív, monomer fehérjék CD spektrumát is feltüntetjük (fekete).

4.2.5. Az eredmények értékelése

Munkánk során az LPA és az SDS kötőhelyeit vizsgáltuk a β 2m felszínén. Kíváncsiak voltunk, hogy melyek azok az aminosavak, amelyek részt vesznek a β 2m – LPA és a β 2m – SDS kölcsönhatásban, és ezáltal szerepet játszanak a fehérje natív szerkezetének destabilizációjában.

Először *in silico* dokkolási kísérleteket végeztünk, hogy meghatározzuk a lehetséges kötőhelyeket. Az eredmények azt mutatták, hogy mindkét vegyület főként a fehérje N-terminális felőli oldalára kötődik, ahol nagy mennyiségben találhatóak pozitív töltésű aminosavak a fehérje felszínén. Ez arra utal, hogy a β 2m és az LPA, illetve SDS között elektrosztatikus kölcsönhatás lép fel, amelyben a fehérjefelszín pozitív lizin és arginin oldalláncai valamint a ligandummolekulák negatív fejcsoportjai vesznek részt. A sejtek felszínén a β 2m az MHC-I komplex könnyű láncát alkotja, és az N-terminális régió ilyenkor a komplex belsejében található. A fehérje felszínén lévő pozitív töltésű aminosavak ekkor elektrosztatikus kölcsönhatásokban vesznek részt az MHC-I nehéz láncával, ezáltal stabilizálva a komplexet (Esposito *et al.*, 2005). Miután a β 2m disszociál a sejt felszínéről és a véráramba kerül, ezek a korábban védett helyzetben lévő aminosavak szabaddá válnak, és kölcsönhatásba léphetnek a vérben található egyéb molekulákkal, amilyen például az LPA. Ezen kívül a vérbe kerülve a fehérje kompakt szerkezete kis mértékben fellazul, átrendeződik. Az egyik ilyen változás, hogy az N-terminus eltávolodik a II-III hurok síkjától, és ezáltal hozzáférhetővé válik a ligandummolekulák számára (Verdone *et al.*, 2002). Ezek a szerkezeti átalakulások is elősegíthetik, hogy a fehérje kölcsönhatásba lépjen más molekulákkal, ami további konformációs változásokat idézhet elő, amelyek végül az amiloidszálak kialakulásához vezethetnek.

A vizsgált ligandummolekulák kötődése a β 2m felszínén változó mértékű klaszterizációt mutatott, ez az SDS-nél volt a leginkább jellemző. Továbbá találtunk egy jól meghatározható kötőhelyet az N-terminális közelében, ami az SDS és az LPA esetében is jól megfigyelhető volt. Figyelembe véve a potenciális kötőhelyeket, illetve a kölcsönhatás feltételezett elektrosztatikus jellegét, irányított mutagenézissel olyan β 2m variánsokat hoztunk létre, ahol egy-egy lizint, illetve arginint alaninra cseréltünk. A dokkolási eredmények alapján feltételeztük, hogy a K6 az LPA és az SDS kötésében is fontos szerepet játszik. Ezen kívül valószínűnek látszott még az R12 jelentősége, elsősorban az β 2m – SDS kölcsönhatásban. Kontrollként a K19 aminosavat választottuk.

A mutációk hatását a fehérje SDS és LPA jelenlétében történő amiloidképzésére ThT fluoreszcenciás mérésekkel vizsgáltuk. A K6A variáns esetében, várákozásainknak megfelelően, szignifikánsan alacsonyabb intenzitásértékeket mértünk SDS és LPA jelenlétében is. Ez azt jelzi, hogy a K6 aminosav valóban fontos szerepet ját-

szik a fehérjemolekula SDS és LPA által kiváltott destabilizációjában. Az R12A SDS esetében a K6A-hoz hasonlóan viselkedett. LPA jelenlétében ez a variáns kisebb különbséget mutatott a vad típushoz képest, mint a K6A, jelezve, hogy az R12 aminosavnak kisebb szerepe van a β 2m – LPA kölcsönhatásban. A kontrollként választott K19A SDS esetében a vad típushoz hasonlóan viselkedett. LPA jelenlétében viszont ez a variáns kisebb mértékű polimerizációt mutatott a vad típushoz képest, és a ThT fluoreszcencia intenzitás értékek az R12A intenzitásértékeihez voltak hasonlóak. Ahhoz, hogy ezt az utóbbi eredményt értelmezni tudjuk, figyelembe kell vennünk az SDS és az LPA kritikus micella koncentrációját. SDS esetében a legnagyobb mértékű amiloidképződés az SDS CMC-értékéhez közeli koncentrációban (500 μ M körül) következik be, majd a micellák megjelenésével a hatékonyság egyre inkább csökken (Yamamoto *et al.*, 2004 a). Ezzel szemben a kísérleteinkben az LPA 300 μ M körüli koncentrációban bizonyult leghatékonyabbnak, ami az adott kísérleti körülmények között jóval az LPA CMC-értéke fölött van. Ez arra utal, hogy az SDS monomerként, míg az LPA micella formájában hat kölcsön a β 2m-nal. Ezt támasztja alá az is, hogy a dokkolási kísérletekben az LPA, leszámítva az N-terminálishoz közeli kötőhelyet, szórtaabb kötődést mutatott az SDS-hez képest. A dokkolási eredmények arra utaltak, hogy a kölcsönhatás SDS és LPA esetében is elektrosztatikus jellegű. Az LPA-micellák felületét negatív töltésű fejcsoportok borítják, ezáltal a micellák kötődése sokkal inkább függ a teljes fehérjefelszín elektrosztatikus mintázatától, nemcsak a specifikus kötőhelyektől. Ezért a fehérje felszínén található pozitív töltések teljes száma sokkal inkább fontos az LPA, mint az SDS kötődésénél. Ez magyarázatként szolgálhat arra, hogy a K19A variáns, az R12A-hoz hasonlóan, csökkent amiloidképződést mutatott LPA esetében, míg SDS jelenlétében a vad típusú fehérjéhez hasonlóan viselkedett. A β 2m variánsok SDS és LPA hatására történő szerkezeti változásait CD spektroszkópiával tanulmányoztuk, az eredmények jó összhangot mutattak a ThT fluoreszcenciás mérésekkel.

Munkánk során a dokkolási kísérletek az összes ligandummolekula esetében monomer formájában történtek, mivel a micellák hatásának szimulálása sokkal nehezebben valósítható meg. Ez felveti a kérdést, hogy LPA esetében mennyire fogadhatók el a kapott eredmények. Ezért fontos megjegyezni, hogy munkánk során a dokkolási eredményeket nem önmagukban értelmeztük, hanem kiindulásnak tekintettük az irányított mutagenézises kísérletekhez, és ilyen szempontból számos hasznos információt szolgáltatnak, hiszen a dokkolás alapján alkotott feltételezések később kísérletes úton is megerősítést nyertek. Ezen kívül az eredmények azt mutatták, hogy a kölcsönhatásban az LPA-micellák felszínén lévő negatív fejcsoportok játsszák a fontos szerepet, ezért a fejcsoportok kötődési mintázatának vizsgálata relevánsnak tekinthető.

Az eredmények tehát az LPA és az SDS esetében is azt sugallják, hogy a destabilizáció az N-terminális fellazulásán keresztül megy végbe. Az N-terminális fontos szerepét a $\beta 2m$ natív szerkezetének stabilitásában már több más is kutatócsoport leírta. Bellotti és munkatársai kimutatták, hogy a $\beta 2m$ -nak egy olyan változata, amelynek az N-terminálisáról az első hat aminosav hiányzik, 26%-ban van jelen a DRA-s betegekben izolált amiloid plakkokban (Bellotti *et al.*, 1998). Ezt az N-terminálison csonkolt variánszt ($\Delta N6\beta 2m$) különféle biofizikai módszerekkel megvizsgálva számos különbséget találtak a vad típusú fehérjéhez képest. A $\Delta N6\beta 2m$ GdnHCl-denaturációs kísérletekben csökkent stabilitást mutatott, és sokkal érzékenyebb volt a kimotripszes emésztéssel szemben. Ezen kívül hidrogén-deutérium kicserélődéses vizsgálatokban szignifikánsan gyorsabb kicserélődést tapasztaltak a $\Delta N6\beta 2m$ esetében. A távoli UV tartományban mért CD spektroszkópiás vizsgálatok alapján a $\Delta N6\beta 2m$ -ban sokkal nagyobb volt a rendezetlen szerkezeti elemek aránya, és a közeli UV tartományban mért CD spektruma is jelentősen különbözött a vad típusú fehérje CD spektrumától, ami eltérő harmadlagos szerkezetre utal. A szerkezeti különbségeket NMR-vizsgálatok is alátámasztották. Továbbá a $\Delta N6\beta 2m$, eltérően az intakt fehérjétől, hajlamos volt semleges pH-n is aggregálódni *in vitro* (Esposito *et al.*, 2000). Összességében ezek az eredmények mind az N-terminális fontos szerepére utalnak a molekula stabilitásában.

Az N- és C-terminális jelentőségét a $\beta 2m$ amiloidképzésében Jones és munkatársai is tanulmányozták. Munkájuk során olyan pontmutációkat hoztak létre a $\beta 2m$ -ban, ahol egy-egy nagy méretű hidrofób oldallánccal rendelkező valin, illetve izoleucin aminosavat alaninra cseréltek, ezáltal csökkentve az adott aminosav által kialakított hidrofób kölcsönhatás erősségét. Ha ez a mutáció az N-, illetve C-terminálishoz tartozó A-, illetve G-számban következett be, a fehérjemolekula stabilitása jelentősen csökkent, és a fehérje semleges pH-n is képes volt 1 nap alatt amiloidszálat képezni. Ellenben ha bárhol máshol történt hasonló mutáció a polipeptidláncban, az így létrejött variánsok, hasonlóan a vad típusú fehérjéhez, nem képeztek amiloidszálat semleges pH-n, még akkor sem, ha a mutáció következtében szintén csökkent a stabilitásuk. Az általuk vizsgált variánsok közül a fentiekén kívül csak az R97A-nál figyeltek meg amiloidképződést semleges pH-n, de csupán 7 nap elteltével; ebben az esetben a mutáció a C-terminális oldatba nyúló szakaszát érintette, és a kicserélt aminosavnak kevés szerepe van a fehérjemolekula stabilitásában. Ezen kívül az A- és G-számban bekövetkezett mutációk esetén a variánsok alacsony pH-n történő amiloidképzése is gyorsabb volt, mint a vad típusú fehérjénél és a többi mutánsnál, továbbá, azoktól eltérően, a szállképződéshez nem volt szükség magok hozzáadására sem. A fenti eredmények azt mutatják, hogy az A- és a G-szál egyfajta védő szerepet tölt be a fehérjében, megakadályozva a monomer fehérjemolekulák aggregációját

(Jones *et al.*, 2003).

Az N-terminális jelentőségét a $\beta 2m$ Cu^{2+} által kiváltott amiloidképzésében szintén többen leírták. Lim és munkatársai a $\beta 2m$ Cu^{2+} -kötőhelyeit vizsgálták a fehérje natív, illetve 8 M urea által denaturált állapotában, és kimutatták, hogy a fehérjemolekula N-terminális mindkét esetben fontos szerepet játszik a Cu^{2+} kötésében (Lim & Vachet, 2004). Srikanth és munkatársai szerint a Cu^{2+} a natív monomer $\beta 2m$ molekulában az N-terminális aminhoz, valamint a Gln2, a His31, és az Asp59 amidcsoportjához kötődik. A Cu^{2+} kötődése ezután olyan szerkezeti változásokat indukál a fehérjében, amelyek elősegítik az oligomerizációt (Srikanth *et al.*, 2009).

Összességében elmondhatjuk, hogy az LPA és az SDS elektrosztatikus kölcsönhatásokon keresztül kötődik a $\beta 2m$ felszínéhez, és hogy a destabilizáló hatásukban kulcsszerepet játszik egy N-terminálishoz közeli kötőhely. A kötődés következtében valószínűleg fellazul az N-terminális szál, és szabaddá válik az addig takarásban lévő β -lemez. Így olyan oldalláncok kerülhetnek a molekula felszínére, melyek hidrofób tulajdonságai hajlamosítják a fehérjét az aggregációra. Eredményeink összhangban állnak a más kutatócsoportok által publikált eredményekkel, amelyek szintén az N-terminális fontos szerepét hangsúlyozzák a fehérjemolekula stabilitásában.

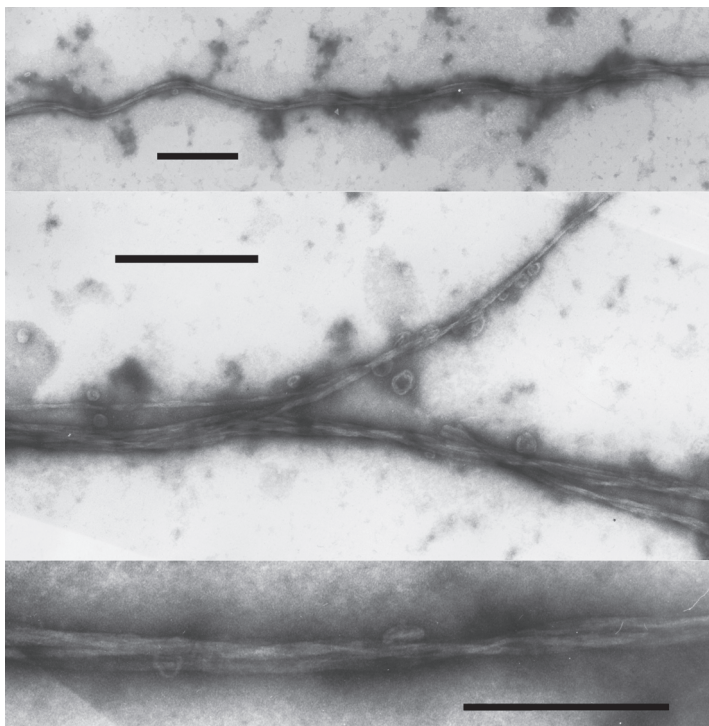
4.3. Az alacsony pH-n és az LPA jelenlétében növesztett amiloidszálak összehasonlítása

4.3.1. A szálak morfológiájának vizsgálata transzmissziós elektron- mikroszkóppal

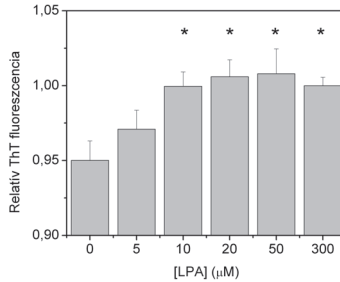
Munkánk következő szakaszában arra voltunk kíváncsiak, hogy az LPA jelenlétében, fiziológias pH-n növesztett amiloidszálak különböznek-e a pH 2,5-n létrehozott szálaktól. Elsőként elvégeztük az LPA jelenlétében növesztett szálak részletes morfológiai vizsgálatát transzmissziós elektronmikroszkóppal, valamint meghatároztuk átlagos vastagságukat. A 4.25. ábrán 300 μ M LPA jelenlétében növesztett, 12 órás amiloidszálak láthatók. A képen jól megfigyelhető, ahogy a vékony protofilamentumok egymás köré csavarodva vastagabb kötegekbe rendeződnek. Méréseink alapján a kötegek vastagsága 25–50 nm-nek bizonyult. Ha ezt összevetjük az irodalmi adatokkal, láthatjuk, hogy pH 2,5-n nőtt szálak esetében ennél kisebb, 5–15 nm-es vastagságot írtak le (Kardos *et al.*, 2005).

4.3.2. A szálak stabilitásának vizsgálata ThT fluoreszcenciával

Irodalmi adatokból tudjuk, hogy a pH 2,5-n növesztett amiloidszálak semleges körüli pH-n azonnal disszociálnak (Yamaguchi *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2004 a).



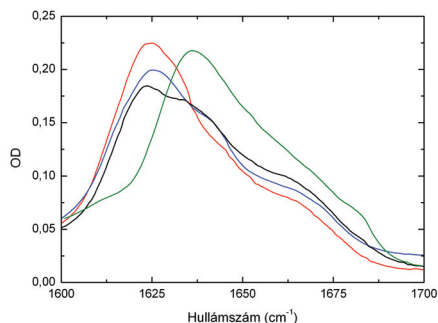
4.25. ábra. 300 μ M LPA JELENLÉTÉBEN LÉTREJÖTT β 2m AMILOIDSZÁLAK MORFOLÓGIAI VIZSGÁLATA. A képen 12 órás amiloidszálak láthatók. A szálakat 1% uranil-acetáttal festettük, majd transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. Lépték: 300 nm.



4.26. ábra. 300 μM LPA JELLENLÉTÉBEN LÉTREJÖTT $\beta 2\text{m}$ AMILOIDSZÁLAK STABILITÁSA FIZIOLÓGIAS pH-N. 300 μM LPA jelenlétében növesztett, az ötödik ciklusból származó amiloidszálakat ötször átmostunk lipidmentes Na-foszfát pufferrel (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4), majd 0,05 mg/ml koncentrációban felfuszpendáltuk olyan pufferben, amely különböző koncentrációkban (0–300 μM) tartalmazott LPA-t. A mintákat ezután 37 °C-on inkubáltuk, és 2 hónap múlva ThT fluoreszcenciával megvizsgáltuk a depolimerizáció mértékét. Az eredményeket átlag \pm SEM formában adtuk meg. A csillagok a szignifikáns eltérést jelzik a lipidmentes kontroll mintához képest, Student-féle t-teszt alapján ($p < 0,05$).

Szerettük volna tudni, hogy vajon az LPA jelenlétében növesztett szálak mennyire stabilak fiziológias körülmények között. 300 μM LPA jelenlétében növesztett amiloidszálakat először többször átmostunk Na-foszfát pufferrel (50 mM Na-foszfát, 100 mM NaCl, pH 7,4), hogy az LPA-t teljesen eltávolítsuk. Ezután olyan pufferben vettük fel őket, amely különböző koncentrációjú (0–300 μM) LPA-t tartalmazott, majd mintákat 37 °C-on inkubáltuk, és ThT fluoreszcenciás mérésekkel követtük a depolimerizációt.

A mérések során a szálak meglepően nagymértékű stabilitást mutattak. Mint a 4.26. ábrán látható, az intenzitásértékek 2 hónap elteltével még a lipidmentes mintákban is elérték a kiindulási érték 95%-át. Továbbá az LPA már 10 μM -os koncentrációban teljes mértékben megvédte a szálakat a depolimerizációtól. Ezek az eredmények egyrészt azért jelentősek, mert bizonyították, hogy az LPA jelenlétében létrejött szálak stabilitása semleges körüli pH-n sokkal nagyobb, mint az alacsony pH-n nőtt száalaké. Másrészt azt is sikerült kimutatni, hogy az LPA jóval a CMC-érték alatti koncentrációban képes stabilizáló hatást kifejteni a fiziológias pH-n létrehozott száalakra.



4.27. ábra. KÜLÖNBÖZŐ KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT LÉTREJÖTT β 2m AMILOID-SZÁLAK SZERKEZETÉNEK ÖSSZEHASONLÍTÁSA FTIR SPEKTROSKÓPIÁVAL. Az ábrán pH 2,5-n (kék), valamint 300 μ M LPA (piros), illetve 500 μ M SDS (fekete) jelenlétében, fiziológiás pH-n növesztett amiloidszálak FTIR spektruma látható. Referenciaként a natív, monomer β 2m spektrumát is feltüntettük (zöld).

4.3.3. A szálak szerkezetének vizsgálata FTIR spektroszkópiával

A különböző körülmények között növesztett amiloidszálak szerkezetét FTIR-spektroszkópiával tanulmányoztuk. Ez a módszer érzékeny a β -szerkezet különbségeire, ezért alkalmas az amiloidszálak vizsgálatára (Zandomenighi *et al.*, 2004). A kísérlet során pH 2,5-n, valamint fiziológiás pH-n, 300 μ M LPA, illetve 500 μ M SDS jelenlétében növesztett szálakat hasonlítottuk össze, a szerkezeti különbségeket a spektrumok amid I csúcsának (1600–1700 cm^{-1}) vizsgálatával tártuk fel. Ezt a csúcsot főként a peptidgerinc C=O kötéseinek vegyértékrezgése hozza létre, ezáltal érzékeny a másodlagos szerkezet változásaira (Dong *et al.*, 1990; Jackson & Mantsch, 1995). A spektrumok felvétele D_2O -t tartalmazó pufferben történt, hogy kiküszöböljük a H_2O elnyelését ebben a tartományban.

A 4.27. ábrán az egyes spektrumok amid I csúcsa látható. Az ábrán referenciaként a natív, monomer β 2m spektrumát is feltüntettük, Kardos és munkatársainak mérése alapján (Kardos *et al.*, 2005). Láthatjuk, hogy a natív monomer fehérje esetében az amid I csúcs maximuma 1635 cm^{-1} -nél található, ami intramolekuláris β -szerkezetre utal. Ettől eltérően az általunk vizsgált amiloidszálak esetében az amid I csúcs maximuma 1622 (300 μ M LPA), 1623 (500 μ M SDS), illetve 1624 (pH 2,5) cm^{-1} -nél volt, ami megfelel az intermolekuláris β -szerkezetre jellemző értékeknek (Zandomenighi *et al.*, 2004). A spektrumokat tanulmányozva látható, hogy az egyes

komponensek pozíciója és nagysága eltérő. Ez arra utal, hogy a különböző körülmények között növesztett amiloidszálak szerkezete eltér egymástól. Ez a szerkezeti különbség magyarázatul szolgálhat a korábban megfigyelt morfológiai és stabilitásbeli különbségekre.

A fenti módszer nem alkalmas arra, hogy pontos információkat szerezzünk az amiloidszálak felépítésének részleteiről, mint a β -lemezek pontos elrendeződése vagy az oldalláncok helyzete. Ehhez további módszerek alkalmazására lenne szükség, mint amilyen például a szilárd fázisú NMR (Makin & Serpell, 2005). Viszont az FTIR-spektroszkópia lehetőséget nyújt arra, hogy viszonylag és gyorsan és egyszerűen feltárjuk a szerkezetek közti esetleges különbségeket.

4.3.4. Az eredmények értékelése

Az a kérdés, hogy vajon az eltérő körülmények között létrejött amiloidszálak szerkezete különbözik-e egymástól, régóta foglalkoztatja az amiloidképződéssel foglalkozó kutatókat. *In vitro* kísérletekben a szálak kialakulását több különféle módszerrel sikerült kiváltani β 2m esetében, mint például az fehérje alacsony pH-n vagy valamilyen adalékanyag jelenlétében történő inkubációja. Ezeknek a körülményeknek egy része nagyon eltér a fiziológias állapotoktól. Ez felveti a kérdést, hogy vajon az ilyen kísérletekből nyert információk mennyire tekinthetők élettanilag relevánsnak. Ha bebizonyosodik, hogy a különböző körülmények között létrejött szálak eltérő szerkezetűek, feltételezhetően a fiziológias körüli pH-n, illetve az élő szervezetben is előforduló adalékanyagok jelenlétében növesztett szálak állnak közelebb a DRA-s betegekből izolált amiloidhoz.

Az irodalomban eddig ellentmondásos adatok jelentek meg a témában. Jahn és munkatársai *in vitro* különböző körülmények között növesztett amiloidszálak szerkezetét hasonlították össze. A vizsgált szálakat három eltérő módszerrel állították elő: alacsony pH-n, semleges pH-n heparin által stabilizált magok hozzáadásával, valamint egy olyan β 2m variánst használva, amely képes semleges pH-n aggregálódni magok, illetve bármiféle adalékanyag nélkül (P32G/17A). Az utóbbi variánsban a 32-es pozícióban, cisz izomer formában lévő prolint glicinnel helyettesítették, amely transz konformációt vesz fel, továbbá a 4-es pozícióban lévő glicint alaninra cserélték, csökkentve ezáltal a hidrofób kölcsönhatás erősségét az N-terminális szál és az általa takart β -lemez között. Az eredményül kapott molekula konformációja a vad típusú, natív, monomer fehérjéhez hasonló, viszont stabilitása jelentősen kisebb, ezáltal képessé válik a semleges pH-n történő aggregációra. A kutatócsoport FTIR-spektroszkópiás vizsgálatok alapján azt állapította meg, hogy a három különféle szál szerkezete szinte teljesen megegyezik. A spektrumok amid I csúcsának maximuma mindhárom esetben 1632 cm^{-1} -nél jelent meg, valamint a strukturális

komponensek elhelyezkedése és mérete is hasonló volt. A csúcs maximumértéke csak kis eltolódást mutatott a natív monomer fehérje esetében általuk mért maximumhoz képest (1634 cm^{-1}). Hasonló eredményeket kaptak a betegekben izolált amiloidszálak spektrumának elemzésével is. A monomer fehérje 60°C -ra történő hevítésével kapott amorf aggregátum, illetve a pH 3,5-n növesztett rövid, görbe szálak esetében az FTIR spektrum amid I csúcsa teljesen eltért a szálakétól, más értéknél érte el a maximumot, és a komponensek is teljesen különbözőek voltak. A kutatócsoport azt a következtetést vonta le az eredményekből, hogy a $\beta 2\text{m}$ amiloidszálaknak egységes szerkezete van, amely független a szálképződés körülményeitől (Jahn *et al.*, 2008).

Kardos és munkatársai szintén különböző körülmények között létrehozott szálak, illetve egyéb aggregátumok szerkezetét tanulmányozták, illetve hasonlították össze a monomer fehérje szerkezetével. Eredményeik alapján a natív monomer fehérje amid I csúcsa 1635 cm^{-1} -nél mutatott maximumot, valamint megjelent egy jól látható komponens 1682 cm^{-1} -nél. Mindez együtt intramolekuláris, antiparallel β -szerkezetre utal (Krimm & Bandekar, 1996). Az általuk vizsgált aggregátumok közül a pH 3,5 és pH 4,0 között keletkezett, rövid, görbe szálak, a pH 5,0–5,5 között létrejött amorf aggregátumok, és a fiziológiás pH-n, 75°C -on történő hőkezeléssel előállított, rövid, görbe szálak antiparallel intermolekuláris szerkezetet mutattak. Ezzel szemben a pH 2,5-n növesztett, hosszú, egyenes, érett szálakra jellegzetes, protofilamentumok egymásba csavarodásával kialakuló morfológia volt a jellemző, és FTIR spektrumuk alapján parallel intermolekuláris β -szerkezettel rendelkeztek. Összevetve ezt a Jahn és munkatársai által tanulmányozott, pH 2,5-n létrejött szálak FTIR spektrumaival, feltűnő különbség, hogy míg náluk az amid I csúcs fő komponense 1632 cm^{-1} -nél jelent meg, közel a natív molekulához, addig Kardos és munkatársainál ez a maximumérték 1621 cm^{-1} -nél található (Kardos *et al.*, 2005).

Fabian és munkatársai szintén az amiloidszálak és más aggregátumok keletkezését kísérő szerkezeti változásokat tanulmányozták. Alacsony pH-n (pH 2,1), viszonylag magas sókoncentráció mellett (0,2 M NaCl) rövid, görbült szálakat állítottak elő, amelyek 50°C -ra hevítve először depolimerizálódtak, majd hosszabb szálakká rendeződtek. Ezek az aggregátumok nem rendelkeztek az érett amiloidszálakra jellemző, protofilamentumok egymásba csavarodásával kialakuló morfológiával, FTIR-spektrumuk pedig antiparallel intermolekuláris β -szerkezetre utalt. Amikor viszont a kezdeti, rövid szálakat 100°C -on hőkezelték, majd újra lehűtötték, az érett amiloidra jellemző, csavarodott szerkezetű szálakat kaptak, melyeknél az amid I csúcs maximuma 1618 cm^{-1} -nél jelent meg, valamint a spektrumból eltűnt az antiparallel β -komponens. Ez arra utal, hogy az így létrejött szálak parallel intermolekuláris β -szerkezettel rendelkeznek. Amikor alacsony pH-n, 37°C -on, rázatással növesztett szálakat tanulmányoztak, teljesen hasonló eredményeket kaptak, mint a 100°C -os

hőkezeléssel kapott szálaknál, morfológiai és FTIR-spektroszkópiás vizsgálatok alapján is. Ezek a vizsgálatok is azt mutatták, hogy az érett szálaknak jellegzetes, elkülönült, egységes szerkezete van, ami eltér az éretlen szálak és egyéb aggregátumok szerkezetétől. A natív, monomer molekula FTIR spektroszkópiás vizsgálata során hasonló értékeket mértek, mint a fent említett két kutatócsoport; az amid I csúcs maximuma 1633 cm^{-1} -nél volt, illetve megjelent 1682 cm^{-1} -nél az antiparallel β -komponens (Fabian *et al.*, 2008).

Összevetve a fenti eredményeket, látható, hogy mindegyik kutatócsoport egyet-ért abban, hogy az amiloidszálak egységes, csak rájuk jellemző szerkezettel rendelkeznek, ami eltér az amorf aggregátumok és az éretlen szálak szerkezetétől. Míg azonban Jahn és munkatársai szerint ez a szerkezet a natív molekulához képest csak kis különbséget mutat, addig a másik két csoport sokkal nagyobb eltérésről számolt be. Zandomenghi és munkatársai szerint FTIR spektroszkópiás vizsgálatokkal jól elkülöníthető egymástól az intramolekuláris β -lemez az amiloidszálakra jellemző, intermolekuláris β -szerkezettől. Munkájukban összegyűjtötték az irodalomban eddig publikált adatokat a különféle amiloidszálak FTIR-spektrumaikról, és összehasonlították β -lemezzel rendelkező natív fehérjék spektrumaival. Megállapították, hogy az intramolekuláris β -szerkezet esetében az amid I csúcs maximuma legnagyobb valószínűséggel $1630\text{--}1642\text{ cm}^{-1}$ közé esik, míg az amiloidszálaknál ez az érték $1613\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ (Zandomenghi *et al.*, 2004). A fenti adatok alapján a Jahn és munkatársai által amiloidszálakra megadott érték még éppen a megadott tartomány határán található. Ezzel szemben a másik két kutatócsoport által mért maximum (1621 , illetve 1618 cm^{-1}) sokkal inkább megfelel az irodalom alapján jellemző értéknek. Az utóbbi értékekkel állnak összhangban Hiramatsu és munkatársainak eredményei is, akik pH 3,5-en növesztett rövid, hajlékony szálak, illetve pH 2,5-n nőtt hosszú, egyenes szálak szerkezetét hasonlították össze, és utóbbinál az amid I csúcs maximumértéke 1625 cm^{-1} -nél volt (Hiramatsu *et al.*, 2010).

Saját korábbi polimerizációs kísérleteink arra utaltak, hogy a különböző körülmények között létrejött amiloidszálak eltérő szerkezetűek. Azt tapasztaltuk ugyanis, hogy ha az LPA jelenlétében, fiziológias pH-n történő szálnövesztéshez alacsony pH-n keletkezett szálakat használunk magként, akkor a fehérjeoldat ThT fluoreszcencia intenzitása először csökken, és csak ezután indul újra növekedésnek, azt jelezve, hogy a magok először jelentős mértékben depolimerizálódnak. Ezzel szemben ha LPA jelenlétében növesztett szálakból létrehozott magokat adtunk az oldathoz, nem történt depolimerizáció, hanem azonnal növekedést tapasztaltunk a ThT fluoreszcencia intenzitás értékekben. Továbbá az utóbbi esetben a szálnövekedés sokkal gyorsabb volt, és már 3-4 óra alatt elérte a maximális közeli ThT fluoreszcencia intenzitás értéket, amelynél gyakorlatilag az összes β 2m molekula amiloidszálak formájában van

jelen. Ehhez alacsony pH-n létrehozott magokat használva kb. 48 órára volt szükség. Feltévésünket megerősítették a későbbi morfológiai vizsgálatok, valamint az LPA jelenlétében létrejött szálak meglepő stabilitása fiziológiás pH-n, ami szintén jelentős különbség az alacsony pH-n nőtt szálakhoz képest. Ezek után FTIR-spektroszkópiás vizsgálatokkal összehasonlítottuk az alacsony pH-n, valamint fiziológiás pH-n, LPA, illetve SDS jelenlétében növesztett amiloidszálak szerkezetét. A spektrumokat tanulmányozva látható, hogy az egyes strukturális komponensek pozíciója és nagysága eltér az egyes szálak esetében, ami strukturális különbségekre utal.

Eredményeinket összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a kísérleteinkben különböző körülmények között létrehozott amiloidszálak morfológiájukban, stabilitásukban és szerkezetükben is eltérnek egymástól. Feltételezzük, hogy az LPA jelenlétében, fiziológiás körülmények között növesztett szálak jobban hasonlítanak a DRA-s betegekben található szálakhoz, mint az alacsony pH-n létrejötték. Ezek az eredmények megerősítették, hogy fontos tanulmányozni a fiziológiához közeli körülmények között történő amiloidképződést.

4.4. A kísérletek élettani relevanciája

Nagyon fontos kérdés, hogy az eredményeink mennyire tekinthetők élettanilag relevánsnak, azaz hogy az LPA-nak lehet-e ténylegesen szerepe a DRA kialakulásában. Az LPA egy vérben jelen lévő lizofosfolipid mediátor, így megvan a lehetősége, hogy kölcsönhatásba lépjen a vérben keringő monomer $\beta 2m$ molekulákkal. Egy tanulmány szerint az LPA átlagos koncentrációja a szérumban $3\mu M$ körül van egészséges egyéneknél. Ezzel szemben petefészekrákban szenvedő pácienseknél ez az érték elérheti a $15\text{--}20\mu M$ -t (Meleh *et al.*, 2007). Feltehetően az LPA-koncentráció ennek többszöröse is lehet időszakosan és lokálisan, a lipid felszabadulásának helyén.

Kísérleteinkben a $300\mu M$ LPA-koncentráció bizonyult a leghatékonyabbnak az amiloidképződés indukálásában, bár kis mennyiségű szálképződést már $100\mu M$ LPA jelenlétében is detektáltunk. Limitált proteolízises vizsgálataink során már $25\mu M$ LPA-koncentrációnál tapasztaltuk a monomer fehérjemolekula destabilizációját, továbbá $10\mu M$ LPA teljes mértékben megakadályozta a fiziológiás pH-n növesztett szálak depolimerizációját. Az utóbbi értékek közel állnak a szérumban mérhető patofiziológiás LPA-koncentrációkhoz.

Kimutatták továbbá, hogy vesebetegségben szenvedő, hosszú ideje hemodialízisen részesülő páciensek vérében megemelkedik bizonyos lipidek, többek között az LPA koncentrációja (Sasagawa *et al.*, 1998; Ookoshi *et al.*, 2008). Ezek a tanulmányok nem szolgálnak magyarázattal arra nézve, hogy mi lehet az oka az meg-növekedett lipidkoncentrációknak. Valószínűnek tűnik, hogy az LPA-koncentráció

emelkedése a vérlemezkék aktiválódásával áll kapcsolatban. Ismert tény, hogy a dialízismembránnal való kontaktus aktivál bizonyos vérsejteket, köztük a vérlemezkéket (Sirioli *et al.*, 2002; Thijs *et al.*, 2007), az aktivált vérlemezkékből pedig LPA szabadul fel (Sano *et al.*, 2002). A jövőben ezért fontos lenne megmérni a betegek vérében közvetlenül a hemodialízis után található LPA koncentrációját.

Gellermann és munkatársai különféle amiloidózisokban szenvedő betegekből izolált amiloid lerakódások lipidkomponenseit tanulmányozták. Megállapították, hogy a β 2m amiloidszálak környezetében jelentős mennyiségű LPC található, ami az LPA előanyaga (Gellermann *et al.*, 2005). Bár vizsgálataik az LPA-ra nem terjedtek ki, ez az eredmény is arra utal, hogy a kapcsolódó lipidek fontos szerepet játszhatnak a szálak kialakulásában vagy stabilizálásában.

Bár az LPA a szálak depolimerizációját szubmicelláris koncentrációban is képes volt megakadályozni, a méréseink azt mutatták, hogy a monomer β 2m molekulák az LPA-micellákkal hatnak kölcsön az általunk alkalmazott kísérleti körülmények között. Ez arra utal, hogy a fehérje natív szerkezetének destabilizálásához a lipid asszociált formája szükséges. A vérben az LPA LDL-hez (Siess *et al.*, 1999), vagy albuminhoz (Tigyi *et al.*, 1992) kötötten fordul elő. Így az LPA az élő szervezetben is jelen van a kölcsönhatáshoz szükséges, asszociált formában.

Kísérleteinkben az amiloidszálak kialakulása befejeződött néhány órán vagy néhány napon belül. A DRA kialakulása ezzel szemben egy lassú folyamat, amely több évig is eltarthat. Ez az időbeli különbség összefügghet azzal, hogy a vérben alacsonyabb az LPA átlagos koncentrációja, mint a mi *in vitro* modellrendszerünkben.

Valószínű, hogy a DRA kialakulásában számos faktor együttesen játszik közre. A fenti eredmények és az irodalmi adatok alapján úgy gondoljuk, hogy az LPA egyike lehet azoknak a vegyületeknek, amelyek *in vivo* hozzájárulhatnak a β 2m amiloidszálak kialakulásához.

Összefoglalás

Munkánk során a vesedialízishez kötött amiloidózisban szerepet játszó β_2 -mikroglobulin (β_2m) és a lizofoszfatidsav (LPA), egy a vérben jelen lévő lizofoszfolipid mediátor kölcsönhatását tanulmányoztuk.

A munka első szakaszában a kölcsönhatás fő biokémiai és biofizikai paramétereinek meghatározását tűztük ki célul. Fluoreszcencia és CD spektroszkópiával, valamint DSC mérésekkel kimutattuk, hogy az LPA kölcsönhat a natív, monomer β_2m molekulákkal, és destabilizálja azok szerkezetét. Ezáltal a fehérje amiloidképzésre hajlamos állapotba kerül, és amiloid magok jelenlétében szálnövekedés figyelhető meg. ITC mérésekkel vizsgáltuk a monomer β_2m és az LPA micellák kölcsönhatását, az 520 ± 200 nM egyensúlyi disszociációs állandó erős kötődésre utal. Megállapítottuk továbbá, hogy az LPA képes stabilizálni az amiloidszálak szerkezetét, megvédve őket a depolimerizációtól.

A munka folytatásaként célul tűztük ki az LPA, illetve szerkezeti analógja, az SDS kötőhelyeinek meghatározását a fehérje felszínén. *In silico* dokkolási kísérletek, illetve irányított mutagenézises vizsgálatok alapján feltételezzük, hogy a molekulák között elektrosztatikus kölcsönhatás jön létre, amelyben az LPA illetve SDS negatív feji csoportjai és a β_2m pozitív lizin és arginin oldalláncjai vesznek részt. Az eredmények arra utaltak, hogy az LPA és az SDS destabilizáló hatásában kulcsszerepet játszik egy N-terminálishoz közeli kötőhely a fehérjemolekula felszínén. A kötődés következtében valószínűleg fellazul az N-terminális szál, és szabaddá válik az addig takarásban lévő β -lemez. Így olyan oldalláncok kerülhetnek a molekula felszínére, melyek hidrofób tulajdonságai hajlamosítják a fehérjét az aggregációra.

Végül arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az LPA jelenlétében, fiziológias pH-n növesztett amiloidszálak különböznek-e az alacsony pH-n létrejött szálaktól. A szálak vizsgálatát fluoreszcencia- és FTIR-spektroszkópiával, valamint transzmissziós elektronmikroszkóppal végeztük. Megállapítottuk, hogy a kétféle amiloid morfológiájában, stabilitásában és szerkezetében is eltér egymástól. Feltételezzük, hogy az LPA jelenlétében, fiziológias pH-n növesztett szálak közelebb állnak a betegkéből izolált amiloidhoz.

A fenti eredmények számos fontos információt tártak fel a β_2m –LPA kölcsönhatás mechanizmusáról, és hozzájárulhatnak a β_2m amiloidképzésének, illetve a vesedialízishez kötött amiloidózis kialakulásának jobb megértéséhez.

Summary

In this work our aim was to study the role of lysophosphatidic acid (LPA), an *in vivo* occurring lysophospholipid mediator in the amyloid formation of β_2 -microglobulin (β_2m), a protein responsible for dialysis-related amyloidosis.

In the first part of the research, we characterized the interaction by standard biochemical-biophysical methods. Fluorescence and CD spectroscopy, as well as differential scanning calorimetry measurements showed that LPA destabilizes the structure of monomeric β_2m inducing a partially unfolded form; this intermediate is capable of fibril extension in a nucleation-dependent manner. Determination of the dissociation equilibrium constant by isothermal titration calorimetry indicated that β_2m exhibits high affinity for LPA micelles. Furthermore, we found that LPA stabilizes the pre-formed amyloid fibrils and prevents them from dissociation.

To further characterize the mechanism of LPA-induced amyloid formation, our aim was to determine the binding sites of LPA on the surface of the protein. We also expanded these studies to SDS, which can be considered as a structural analogue of LPA. Based on the results of *in silico* docking experiments and site-directed mutagenesis, we assume that LPA and SDS bind to β_2m through electrostatic interactions, where the positively charged lysine and arginine residues interact with the negative headgroup of LPA and SDS. Furthermore, our results suggest the N-terminal region of the molecule plays an important role in SDS- and LPA-induced destabilization of the protein.

Finally, we compared the the morphology and structure of amyloid fibrils formed at low pH, and those grown in the presence of LPA. Fluorescence and FTIR spectroscopy experiments and transmission electron microscopical studies revealed that fibrils grown under different conditions have different morphology, stability and structure. We assume that fibrils grown at physiological pH, in the presence of LPA are more similar to amyloid isolated from patients. Our observations emphasize the importance to study the amyloid formation of β_2m at physiological pH.

Our studies revealed several important aspects of the β_2m – LPA interaction, and may contribute to the better understanding of the amyloid formation of β_2m and the development of dialysis-related amyloidosis.

Ábrák jegyzéke

1.1. A β_2 -mikroglobulin molekula szerkezete.	7
4.1. A vizsgált lipidek szerkezeti képlete.	24
4.2. Különböző lipidek hatása a β_2 m amiloidképzésre fiziológias pH-n.	24
4.3. LPA jelenlétében létrejött β_2 m amiloidszálak elektronmikroszkópos képe.	25
4.4. β_2 m amiloidszálak keletkezése fiziológias pH-n, az LPA-koncentráció függvényében.	26
4.5. A natív, monomer β_2 m szerkezeti változásai különböző koncentrációjú LPA hatására.	28
4.6. LPA hatására létrejött amiloidszálak távoli UV tartományban felvett CD spektruma.	30
4.7. A β_2 m különböző konformációjú monomer és aggregált formáinak összehasonlítása CD spektroszkópiával.	31
4.8. Az LPA által destabilizált monomer β_2 m molekulák ANS fluoreszcenciája.	32
4.9. A β_2 m kalorimetriás olvadásgörbéje LPA, illetve LPC jelenlétében.	33
4.10. A monomer β_2 m konformációjának hatása az amiloidképződésre.	34
4.11. A monomer β_2 m limitált proteolízise LPA jelenlétében.	35
4.12. Az LPA kritikus micella koncentrációjának meghatározása ITC-vel.	36
4.13. A β_2 m – LPA kölcsönhatás vizsgálata ITC-vel.	37
4.14. A monomer β_2 m kémiai keresztkötése DTSP-vel 300 μ M LPA jelenlétében.	38
4.15. β_2 m amiloidszálak disszociációja hőkezelés hatására.	40
4.16. Különböző vegyületek hatása a β_2 m amiloidszálak stabilitására.	40
4.17. Az LPA hatása a β_2 m amiloidszálak stabilitására.	41
4.18. A β_2 m felszíni elektrosztatikus potenciáltérképe.	46
4.19. Az LPA és az SDS dokkolása a β_2 m felszínén.	47
4.20. Az LPC, az SIP és az SPC dokkolása a β_2 m felszínén.	48
4.21. A β_2 m irányított mutagenézise.	48
4.22. A β_2 m variánsok amiloidképzése 500 μ M SDS jelenlétében.	49
4.23. A β_2 m variánsok amiloidképzése 300 μ M LPA jelenlétében.	50
4.24. A β_2 m variánsok szerkezeti változásai SDS és LPA jelenlétében.	51
4.25. 300 μ M LPA jelenlétében létrejött β_2 m amiloidszálak morfológiai vizsgálata.	56

4.26. 300 μ M LPA jelenlétében létrejött β 2m amiloidszálak stabilitása fiziológiás pH-n.	57
4.27. Különböző körülmények között létrejött β 2m amiloidszálak szerkezetének összehasonlítása FTIR spektroszkópiával.	58

Táblázatok jegyzéke

3.1. A mutagenesis során használt primerek.	16
4.1. A másodlagos szerkezeti elemek aránya a monomer β 2m különböző formáinál a távoli UV tartományban felvett CD spektrumok alapján.	29

Rövidítések jegyzéke

ANS	8-anilino-naftalin szulfonsav
β 2m	β 2-mikroglobulin
CD	Cirkuláris dikroizmus
CMC	<i>Critical micelle concentration</i> , kritikus micella koncentráció
DRA	<i>Dialysis-related amyloidosis</i> , vesedialízishez kötött amiloidózis
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i> , differenciális pásztázó kalorimetria
DTSP	Ditiobisz-(szukcinimidil-propionát)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilén-diamin-tetraacetát
GdnHCl	Guanidin-hidroklorid
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i> , Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinétánszulfonsav
IPMDH	3-izopropilmalát dehidrogenáz
IPTG	Izopropil- β -D-tiogalaktozid
ITC	<i>Isothermal titration calorimetry</i> , izotermális titrációs kalorimetria
K_d	Egyensúlyi disszociációs állandó
LB	Luria-Bertani
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> , alacsony sűrűségű lipoprotein
LPA	Lizofoszfatidsav
LPC	Lizofoszfatidilkolin
PAGE	Poliakrilamid gélelektroforézis
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , polimeráz láncreakció
PDB	Protein Data Bank
S1P	Szfingozin-1-foszfát
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , standard hiba
SDS	Nátrium dodecil szulfát
SPC	Szfingozilfoszforilkolin
TEM	Transzmissziós elektronmikroszkóp
ThT	Thioflavin T
Tricin	N-[2-hidroxi-1,1-bisz(hidroximetil)etil]-glicin
Tris	Trisz-(hidroxi-metil)-amino-metán

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Kardos Józsefnek és Dr. Liliom Károlynak, amiért lehetőséget adtak, hogy kutatócsoportjukban dolgozhassak, és a munka során nyújtott szakmai útmutatásukért.

Köszönöm Dr. Kovács Jánosnak az elektronmikroszkópos munkák során nyújtott segítségét.

Szeretném megköszönni Gyimesi Gergelynek a dokkolási és elektrosztatikus számításokat, amelyek fontos részét képezik doktori dolgozatomnak.

Köszönettel tartozom Dr. Gombos Lindának a limitált proteolízises kísérletekért, valamint Micsonai Andrásnak a CD spektroszkópiás mérések kiértékelése során nyújtott segítségéért.

Köszönöm Dr. Kovács Erikának a munka kezdeti szakaszában nyújtott segítségét és tanácsait.

Szeretnék köszönetet mondani a családomnak: Édesanyámnak, aki lehetővé tette, hogy egyetemre járhassak és eljuthassak idáig, és férjemnek, Dékány Istvánnak, minden szeretetéért és támogatásáért. Végül szeretném megköszönni Apósomnak a doktori védés szervezésében nyújtott felbecsülhetetlen segítségét.

Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények

Referált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

Pál-Gábor, H., Gombos, L., Micsonai, A., Kovács, E., Petrik, É., Kovács, J., Gráf, L., Fidy, J., Naiki, H., Goto, Y., Liliom, K., and Kardos, J. (2009): Mechanism of lysophosphatidic acid-induced amyloid fibril formation of β_2 -microglobulin *in vitro* under physiological conditions. *Biochemistry* 48(24): 5689-99

Kardos, J., Micsonai, A., Pál-Gábor, H., Petrik, É., Gráf, L., Lee, Y. H., Naiki, H., and Goto, Y. (2011): Reversible heat-induced dissociation of β_2 -microglobulin amyloid fibrils. *Biochemistry* [Epub ahead of print].

Előkészületben :

Pál-Gábor, H., Gyimesi, G., Gombos, L., Kékesi, K., Liliom, K., and Kardos, J.: The role of the N-terminus of β_2 -microglobulin in the LPA- and SDS-induced amyloid formation.

Nemzetközi konferenciákon bemutatott eredmények

Pál-Gábor, H., Gombos, L., Micsonai, A., Kovács, E., Kovács J., Gráf, L, Goto, Y., Liliom, K., and Kardos, J. (2007): The role of lysophosphatidic acid in amyloid formation of β_2 -microglobulin under physiological conditions. Regional Biophysics Conference, Balatonfüred (poszter).

Pál-Gábor, H., Gombos, L., Kovács, J., Kardos, J., and Liliom, K. (2008): Lysophosphatidic acid selectively interacts with β_2 -microglobulin and induces its amyloid fibril formation. FEBS Workshop “Lipids as regulators of cell function”, Spetses, Görögország (poszter).

Pál-Gábor, H., Gyimesi, G., Gombos, L., Kovács, J., Liliom, K., and Kardos, J. (2009): Mechanism of lysophosphatidic acid-induced amyloid fibril formation of β_2 -microglobulin *in vitro* under physiological conditions. FEBS Practical & Lecture Course “Sofia School of Protein Science: From basic research to drug design”, Szófia, Bulgária (poszter).

Irodalomjegyzék

- Abe, T., Uchita, K., Orita, H., Kamimura, M., Oda, M., Hasegawa, H., Kobata, H., Fukunishi, M., Shimazaki, M., Abe, T., Akizawa, T., and Ahmad, S. (2003): Effect of beta(2)-microglobulin adsorption column on dialysis-related amyloidosis. *Kidney Int.* 2003 Oct.;64(4): 1522-8.
- Alakoskela, J. M., Jutila, A., Simonsen, A. C., Pirneskoski, J., Pyhäjoki, S., Turunen, R., Marttila, S., Mouritsen, O. G., Goormaghtigh, E., and Kinnunen, P. K. (2006): Characteristics of fibers formed by cytochrome c and induced by anionic phospholipids. *Biochemistry* 45(45): 13447-53.
- Andrade, M. A., Chacón, P., Merelo, J. J., and Morán, F. (1993): Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng.* 6(4): 383-90.
- Antwi, K., Mahar, M., Srikanth, R., Olbris, M. R., Tyson, J. F., and Vachet, R. W. (2008): Cu(II) organizes beta-2-microglobulin oligomers but is released upon amyloid formation. *Protein Sci.* 17(4): 748-59.
- Aoike, I., Gejyo, F., and Arakawa, M. (1995): Learning from the Japanese Registry: how will we prevent long-term complications? Niigata Research Programme for beta 2-M Removal Membrane. *Nephrol. Dial. Transplant.* 10 Suppl 7: 7-15.
- Aoki, J. (2004): Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 15(5): 477-89.
- Aoki, J., Inoue, A., and Okudaira, S. (2008): Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochim. Biophys. Acta* 2008 Sep;1781(9): 513-8.
- Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., and McCammon, J. A. (2001): Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98(18): 10037-41.
- Bardin, T., Lebaill-Darné, J. L., Zingraff, J., Laredo, J. D., Voisin, M. C., Kreis, H., and Kuntz, D. (1995): Dialysis arthropathy: outcome after renal transplantation. *Am. J. Med.* 99(3): 243-8.
- Bellotti, V., Stoppini, M., Mangione, P., Sunde, M., Robinson, C., Asti, L., Brancaccio, D., and Ferri, G. (1998): Beta2-microglobulin can be refolded into a native state from ex vivo amyloid fibrils. *Eur. J. Biochem.* 258(1): 61-7.

- Bennhold, H. (1922): Specific staining of amyloid by Congo red. *Munchen Med. Wochenschr.* 69: 1537-8.
- Berson, J. F., Theos, A. C., Harper, D. C., Tenza, D., Raposo, G., and Marks, M. S. (2003): Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. *J. Cell Biol.* 161(3): 521-33.
- Bonar, L., Cohen, A. S., and Skinner, M. M. (1969): Characterization of the amyloid fibril as a cross-beta protein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 131(4): 1373-5.
- Campistol, J. M., Ponz E., Muñoz-Gómez, J., Oppenheimer, F., Ricard, M. J., Vilardell, J., and Andreu, J. (1992): Renal transplantation for dialysis amyloidosis. *Transplant. Proc.* 24(1): 118-9.
- Chapman, M. R., Robinson, L. S., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., Normark, S., and Hultgren, S. J. (2002): Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* 295(5556): 851-5.
- Chiba, T., Hagihara, Y., Higurashi, T., Hasegawa, K., Naiki, H., and Goto, Y. (2003): Amyloid fibril formation in the context of full-length protein: effects of proline mutations on the amyloid fibril formation of beta2-microglobulin. *J. Biol. Chem.* 278(47): 47016-24.
- Chiti, F., De Lorenzi, E., Grossi, S., Mangione, P., Giorgetti, S., Caccialanza, G., Dobson, C. M., Merlini, G., Ramponi, G., and Bellotti, V. (2001): A partially structured species of beta2-microglobulin is significantly populated under physiological conditions and involved in fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* 276(50): 46714-21.
- Chiti, F., and Dobson, C. M. (2006): Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 333-66.
- Choi, J. W., Herr, D. R., Noguchi, K., Yung, Y. C., Lee, C. W., Mutoh, T., Lin, M. E., Teo, S. T., Park, K. E., Mosley, A. N., and Chun, J. (2010): LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50: 157-86.
- Claessen, D., Rink, R., de Jong, W., Siebring, J., de Vreugd, P., Boersma, F. G., Dijkhuizen, L., and Wosten, H. A. (2003): A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in *Streptomyces coelicolor* by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev.* 17(14): 1714-26.

- Cohen, A. S., and Calkins, E. (1959): Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature* 183(4669): 1202-3.
- Compton, L. A., and Johnson, W. C. Jr. (1986): Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal. Biochem.* 155(1): 155-67.
- Coutinho, A., Loura, L. M., and Prieto, M. (2011): FRET studies of lipid-protein aggregates related to amyloid-like fibers. *J. Neurochem.* 2011 116(5): 696-701.
- Deléage, G., and Geourjon, C. (1993): An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from circular dichroism spectrum. *Comput. Appl. Biosci.* 9(2): 197-9.
- Divry, P., and Florkin, M. (1927): Sur les propriétés optiques de l'amyloïde. *C. R. Soc. Biol.* 97: 1808-10.
- Dodart, J. C., Bales, K. R., Gannon, K. S., Greene, S. J., DeMattos, R. B., Mathis, C., DeLong, C. A., Wu, S., Wu, X., Holtzman, D. M., and Paul, S. M. (2002): Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model. *Nat. Neurosci.* 5(5): 452-7.
- Doering, D. S., and Matsudaira, P. (1996): Cysteine scanning mutagenesis at 40 of 76 positions in villin headpiece maps the F-actin binding site and structural features of the domain. *Biochemistry* 35(39): 12677-85.
- Dong, A., Huang, P., and Caughey, W. S. (1990): Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry* 29(13): 3303-8.
- Drüeke, T. B., and Massy, Z. A. (2009): Beta2-microglobulin. *Semin. Dial.* 22(4): 378-80.
- Eakin, C. M., Berman, A. J., and Miranker, A. D. (2006): A native to amyloidogenic transition regulated by a backbone trigger. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13(3): 202-8.
- Eakin, C. M., Knight, J. D., Morgan, C. J., Gelfand, M. A., and Miranker, A. D. (2002): Formation of a copper specific binding site in non-native states of beta-2-microglobulin. *Biochemistry* 41(34): 10646-56.
- Eanes, E. D., and Glenner, G. G. (1968): X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J. Histochem. Cytochem.* 16(11): 673-7.

Esposito, G., Corazza, A., Viglino, P., Verdone, G., Pettirossi, F., Fogolari, F., Makek, A., Giorgetti, S., Mangione, P., Stoppini, M., and Bellotti, V. (2005): Solution structure of beta(2)-microglobulin and insights into fibrillogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1753(1): 76-84.

Esposito, G., Michelutti, R., Verdone, G., Viglino, P., Hernández, H., Robinson, C. V., Amoresano, A., Dal Piaz, F., Monti, M., Pucci, P., Mangione, P., Stoppini, M., Merlini, G., Ferri, G., and Bellotti, V. (2000): Removal of the N-terminal hexapeptide from human beta2-microglobulin facilitates protein aggregation and fibril formation. *Protein Sci.* 9(5): 831-45.

Fabian, H., Gast, K., Laue, M., Misselwitz, R., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., and Naumann, D. (2008): Early stages of misfolding and association of beta2-microglobulin: insights from infrared spectroscopy and dynamic light scattering. *Biochemistry* 47(26): 6895-906.

Floege, J., and Ehlerding, G. (1996): Beta-2-microglobulin-associated amyloidosis. *Nephron* 72(1): 9-26.

Gejyo, F., Kawaguchi Y., Hara, S., Nakazawa, R., Azuma, N., Ogawa, H., Koda, Y., Suzuki, M., Kaneda, H., Kishimoto, H., Oda, M., Ei, K., Miyazaki, R., Maruyama, H., Arakawa, M., and Hara, M. (2004): Arresting dialysis-related amyloidosis: a prospective multicenter controlled trial of direct hemoperfusion with a beta2-microglobulin adsorption column. *Artif. Organs.* 28(4): 371-80.

Gellermann, G. P., Appel, T. R., Tannert, A., Radestock, A., Hortschansky, P., Schroeckh, V., Leisner, C., Lutkepohl, T., Shtrasburg, S., Rocken, C., Pras, M., Linke, R. P., Diekmann, S., and Fandrich, M. (2005): Raft lipids as common components of human extracellular amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(18): 6297-302.

Giorgetti, S., Rossi, A., Mangione, P., Raimondi, S., Marini, S., Stoppini, M., Corazza, A., Viglino, P., Esposito, G., Cetta, G., Merlini, G., and Bellotti, V. (2005): Beta2-microglobulin isoforms display an heterogeneous affinity for type I collagen. *Protein Sci.* 14(3): 696-702.

Gorbenko, G. P., and Kinnunen, P. K. (2006): The role of lipid-protein interactions in amyloid-type protein fibril formation. *Chem. Phys. Lipids* 141(1-2): 72-82.

Hagihara, Y., Hong, D. P., Hoshino, M., Enjyoji, K., Kato, H., and Goto, Y. (2002): Aggregation of beta(2)-glycoprotein I induced by sodium lauryl sulfate and lysophospholipids. *Biochemistry* 41(3): 1020-6.

- Hakim, R. M., Wingard, R. L., Husni, L., Parker, R. A., and Parker, T. F. 3rd. (1996): The effect of membrane biocompatibility on plasma beta 2-microglobulin levels in chronic hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 7(3): 472-8.
- Hasegawa, K., Tsutsumi-Yasuhara, S., Ookoshi, T., Ohhashi, Y., Kimura, H., Takahashi, N., Yoshida, H., Miyazaki, R., Goto, Y., and Naiki, H. (2008): Growth of beta(2)-microglobulin-related amyloid fibrils by non-esterified fatty acids at a neutral pH. *Biochem. J.* 416(2): 307-15.
- Hiramatsu, H., Lu, M., Matsuo, K., Gekko, K., Goto, Y., and Kitagawa, T. (2010): Differences in the molecular structure of beta(2)-microglobulin between two morphologically different amyloid fibrils. *Biochemistry* 49(4): 742-51.
- Homma, N., Gejyo, F., Isemura, M., and Arakawa, M. (1989): Collagen-binding affinity of beta-2-microglobulin, a preprotein of hemodialysis-associated amyloidosis. *Nephron* 53(1): 37-40.
- Horwich, A. (2002): Protein aggregation in disease: a role for folding intermediates forming specific multimeric interactions. *J. Clin. Invest.* 110(9): 1221-32.
- Hubbard, S. J. (1998): The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1382(2): 191-206.
- Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996): VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14(1): 33-8, 27-8.
- Iconomidou, V. A., Vriend, G., Hamodrakas, S. J. (2000): Amyloids protect the silkworm oocyte and embryo. *FEBS Lett.* 479(3): 141-5.
- Iwata, K., Matsuura, T., Sakurai, K., Nakagawa, A., and Goto, Y. (2007): High-resolution of beta2-microglobulin formed at pH 7.0. *J. Biochem.* 142(3): 413-9.
- Jackson, M., and Mantsch, H. H. (1995): The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30(2): 95-120.
- Jadoul, M., Malghem, J., Pirson, Y., Maldague, B., and van Ypersele de Strihou, C. (1989): Effect of renal transplantation on the radiological signs of dialysis amyloid osteoarthropathy. *Clin. Nephrol.* 32(4):194-7.

- Jahn, T. R., Parker, M. J., Homans, S. W., and Radford, S. E. (2006): Amyloid formation under physiological conditions proceeds via a native-like folding intermediate. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13(3): 195-201.
- Jahn, T. R., Tennent, G. A., and Radford, S. E. (2008): A common beta-sheet architecture underlies in vitro and in vivo beta2-microglobulin amyloid fibrils. *J. Biol. Chem.* 283(25): 17279-86.
- Jones, S., Smith, D. P., and Radford, S. E. (2003): Role of the N and C-terminal strands of beta 2-microglobulin in amyloid formation at neutral pH. *J. Mol. Biol.* 330(5): 935-41.
- Kabsch, W., and Sander, C. (1983): Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22(12): 2577-637.
- Kameda, A., Hoshino, M., Higurashi, T., Takahashi, S., Naiki, H., and Goto, Y. (2005): Nuclear magnetic resonance characterization of the refolding intermediate of beta2-microglobulin trapped by non-native prolyl peptide bond. *J. Mol. Biol.* 348(2): 383-97.
- Kardos, J., Okuno, D., Kawai, T., Hagihara, Y., Yumoto, N., Kitagawa, T., Závodszky, P., Naiki, H., and Goto, Y. (2005): Structural studies reveal that the diverse morphology of beta(2)-microglobulin aggregates is a reflection of different molecular architectures. *Biochim. Biophys. Acta* 21753(1): 108-20.
- Kardos, J., Yamamoto, K., Hasegawa, K., Naiki, H., and Goto, Y. (2004): Direct measurement of the thermodynamic parameters of amyloid formation by isothermal titration calorimetry. *J. Biol. Chem.* 279(53): 55308-14.
- Kazama, J. J., Maruyama, H., and Gejyo, F. (2001): Reduction of circulating beta2-microglobulin level for the treatment of dialysis-related amyloidosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16 Suppl 4: 31-5.
- Kihara, M., Chatani, E., Sakai, M., Hasegawa, K., Naiki, H., and Goto, Y. (2005): Seeding-dependent maturation of beta2-microglobulin amyloid fibrils at neutral pH. *J. Biol. Chem.* 280(12): 12012-8.
- Koch, K. M. (1992): Dialysis-related amyloidosis. *Kidney Int.* 41(5): 1416-29.
- Krimm, S., and Bandekar, J. (1986): Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein Chem.* 38: 181-364.

- Kyle, R. A. (2001): Amyloidosis: a convoluted story. *Br. J. Haematol.* 114(3): 529-38.
- Larson, J., Lynch, G., Games, D., and Seubert, P. (1999): Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. *Brain Res.* 840(1-2): 23-35.
- Lesse, A. J., Campagnari, A. A., Bittner, W. E., and Apicella, M. A. (1990): Increased resolution of lipopolysaccharides and lipooligosaccharides utilizing tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Immunol. Methods* 126 (1): 109-17.
- Li, Z., Mintzer, E., and Bittman, R. (2004): The critical micelle concentrations of lysophosphatidic acid and sphingosylphosphorylcholine. *Chem. Phys. Lipids* 130(2): 197-201.
- Lim, J., and Vachet, R. W. (2004): Using mass spectrometry to study copper-protein binding under native and non-native conditions: beta-2-microglobulin. *Anal. Chem.* 76(13): 3498-504.
- Lin, M. E., Herr, D. R., and Chun, J. (2010): Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: signaling properties and disease relevance. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 91(3-4): 130-8.
- Lue, L. F., Kuo, Y. M., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J. H., Rydel, R. E., and Rogers, J. (1999): Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 155(3): 853-62.
- Mackay, J. P., Matthews, J. M., Winefield, R. D., Mackay, L. G., Haverkamp, R. G., and Templeton, M. D. (2001): The hydrophobin EAS is largely unstructured in solution and functions by forming amyloid-like structures. *Structure* 9(2): 83-91.
- Maji, S. K., Perrin, M. H., Sawaya, M. R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R. A., Singru, P. S., Nilsson, K. P., Simon, R., Schubert, D., Eisenberg, D., Rivier, J., Sawchenko, P., Vale, W., and Riek, R. (2009): Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science* 325(5938): 328-32.
- Makin, O. S., and Serpell, L. C. (2005): Structures for amyloid fibrils. *FEBS J.* 272(23): 5950-61.

- Manavalan, P., and Johnson, W. C. Jr. (1987): Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.* 167(1): 76-85.
- McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Beyreuther, K., Bush, A. I., and Masters, C. L. (1999): Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 46(6): 860-6.
- McParland, V. J., Kad, N. M., Kalverda, A. P., Brown, A., Kirwin-Jones, P., Hunter, M. G., Sunde, M., and Radford, S. E. (2000): Partially unfolded states of beta(2)-microglobulin and amyloid formation in vitro. *Biochemistry* 39(30): 8735-46.
- Meleh, M., Pozlep, B., Mlakar, A., Meden-Vrtovec, H., and Zupancic-Kralj, L. (2007): Determination of serum lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian cancer. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 858(1-2): 287-91.
- Moechars, D., Dewachter, I., Lorent, K., Reversé, D., Baekelandt, V., Naidu, A., Tesseur, I., Spittaels, K., Haute, C. V., Checler, F., Godaux, E., Cordell, B., and Van Leuven, F. (1999): Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J. Biol. Chem.* 274(10): 6483-92.
- Morgan, C. J., Gelfand, M., Atreya, C., and Miranker, A. D. (2001): Kidney dialysis-associated amyloidosis: a molecular role for copper in fiber formation. *J. Mol. Biol.* 309(2): 339-45.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., and Olson, A. J. (1998): Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* 19(14): 1639-62.
- Mourad, G., and Argilés, A. (1996): Renal transplantation relieves the symptoms but does not reverse beta 2-microglobulin amyloidosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 7(5): 798-804.
- Myers, S. L., Jones, S., Jahn, T. R., Morten, I. J., Tennent, G. A., Hewitt, E. W., and Radford, S. E. (2006): A systematic study of the effect of physiological factors on beta2-microglobulin amyloid formation at neutral pH. *Biochemistry* 45(7): 2311-21.

Naiki, H., Hashimoto, N., Suzuki, S., Kimura, H., Nakakuki, K., and Gejyo, F. (1997): Establishment of a kinetic model of dialysis-related amyloid fibril extension in vitro. *Amyloid* 4(4) : 223-32.

Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., and Takeda, T. (1989): Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal. Biochem.* 177(2): 244-9.

Naiki, H., and Gejyo, F. (1999): Kinetic analysis of amyloid fibril formation. *Methods Enzymol.* 309: 305-18.

Nelson, S. R., Hawkins, P. N., Richardson, S., Lavender, J. P., Sethi, D., Gower, P. E., Pugh, C. W., Winearls, C. G., Oliver, D. O., and Pepys, M. B. (1991): Imaging of haemodialysis-associated amyloidosis with 123I-serum amyloid P component. *Lancet* 338(8763): 335-9.

Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C. B., Condrón, M. M., Axelman, K., Forsell, C., Sten, C., Luthman, J., Teplow, D. B., Younkin, S. G., Näslund, J., and Lannfelt, L. (2001): The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat. Neurosci.* 4(9): 887-93.

Ohashi, K., Kisilevsky, R., and Yanagishita, M. (2002): Affinity binding of glycosaminoglycans with beta(2)-microglobulin. *Nephron* 90(2): 158-68.

Okudaira, S., Yukiura, H., and Aoki, J. (2010): Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie* 92(6): 698-706.

Ono, K., and Uchino, F. (1994): Formation of amyloid-like substance from beta-2-microglobulin in vitro. Role of serum amyloid P component: a preliminary study. *Nephron* 66(4): 404-7.

Ookoshi, T., Hasegawa, K., Ohashi, Y., Kimura, H., Takahashi, N., Yoshida, H., Miyazaki, R., Goto, Y., and Naiki, H. (2008): Lysophospholipids induce the nucleation and extension of beta2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23(10): 3247-55.

Pepys, M. B. (2001): Pathogenesis, diagnosis and treatment of systemic amyloidosis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 356(1406): 203-11.

Pickett, T. M., Cruickshank, A., Greenwood, R. N., Taube, D., Davenport, A., and Farrington, K. (2002): Membrane flux not biocompatibility determines beta-2-microglobulin levels in hemodialysis patients. *Blood Purif.* 20(2): 161-6.

- Provencher, S. W. (1982): CONTIN: A general-purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral-equations. *Comput. Phys. Commun.* 27(3): 229-42.
- Provencher, S. W., and Glöckner, J. (1981): Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20(1): 33-7.
- Relini, A., De Stefano, S., Torrassa, S., Cavalleri, O., Rolandi, R., Gliozzi, A., Giorgetti, S., Raimondi, S., Marchese, L., Verga, L., Rossi, A., Stoppini, M., and Bellotti, V. (2008): Heparin strongly enhances the formation of beta2-microglobulin amyloid fibrils in the presence of type I collagen. *J. Biol. Chem.* 283(8): 4912-20.
- Relini, A., Canale, C., De Stefano, S., Rolandi, R., Giorgetti, S., Stoppini, M., Rossi, A., Fogolari, F., Corazza, A., Esposito, G., Gliozzi, A., and Bellotti, V. (2006): Collagen plays an active role in the aggregation of beta2-microglobulin under physiopathological conditions of dialysis-related amyloidosis. *J. Biol. Chem.* 281(24): 16521-9.
- Rennella, E., Corazza, A., Giorgetti, S., Fogolari, F., Viglino, P., Porcari, R., Verga, L., Stoppini, M., Bellotti, V., and Esposito, G. (2010): Folding and fibrillogenesis: clues from beta2-microglobulin. *J. Mol. Biol.* 401(2): 286-97.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2000): Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sano, T., Baker, D., Virag, T., Wada, A., Yatomi, Y., Kobayashi, T., Igarashi, Y., and Tigyi, G. (2002): Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *J. Biol. Chem.* 277(24): 21197-206.
- Sasagawa, T., Suzuki, K., Shiota, T., Kondo, T., and Okita, M. (1998): The significance of plasma lysophospholipids in patients with renal failure on hemodialysis. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (Tokyo) 44, 809-18.
- Schägger, H., and von Jagow, G. (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166(2): 368-79.
- Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas', A. F., and Gilmanshin, R. I. (1991): Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers* 31(1): 119-28.

- Sengupta, S., Wang, Z., Tipps, R., and Xu, Y. (2004): Biology of LPA in health and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15(5): 503-12.
- Siess, W., Zangl, K. J., Essler, M., Bauer, M., Brandl, R., Corrinth, C., Bittman, R., Tigyi, G., and Aepfelbacher, M. (1999): Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96(12): 6931-6.
- Simpson, R. J. (2002): Proteins and proteomics: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Sipe, J. D., and Cohen, A. S. (2000): Review: history of the amyloid fibril. *J. Struct. Biol.* 130(2-3): 88-98.
- Siroli, V., Ballone, E., Di Stante, S., Amoroso, L., and Bonomini, M. (2002): Cell activation and cellular-cellular interactions during hemodialysis: effect of dialyzer membrane. *Int. J. Artif. Organs* 25(6): 529-37.
- Skora, L., Becker, S., and Zweckstetter, M. (2010): Molten globule precursor states are conformationally correlated to amyloid fibrils of human beta-2-microglobulin. *J. Am. Chem. Soc.* 132(27): 9223-5.
- Sreerama, N., and Woody, R. W. (1993): A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular-dichroism. *Anal. Biochem.* 209(1): 32-44.
- Srikanth, R., Mendoza, V. L., Bridgewater, J. D., Zhang, G., and Vachet, R. W. (2009): Copper binding to beta-2-microglobulin and its pre-amyloid oligomers. *Biochemistry* 48(41): 9871-81.
- Stefani, M., and Dobson, C. M. (2003): Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med.* 81(11): 678-99.
- Sunde, M., and Blake, C. (1997): The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv. Protein Chem.* 50: 123-59.
- Tan, S. Y., Irish, A., Winearls, C. G., Brown, E. A., Gower, P. E., Clutterbuck, E. J., Madhoo, S., Lavender, J. P., Pepys, M. B., and Hawkins, P. N. (1996): Long term effect of renal transplantation on dialysis-related amyloid deposits and symptomatology. *Kidney Int.* 50(1): 282-9.

- Tanford, C. (1974): Thermodynamics of micelle formation: prediction of micelle size and size distribution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71(5): 1811-5.
- Taylor D. R., and Hooper N. M. (2007): Role of lipid rafts in the processing of the pathogenic prion and Alzheimer's amyloid-beta proteins. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 18(5): 638-48.
- Thijs, A., Grooteman, M. P., Zweegman, S., Nube, M. J., Huijgens, P. C., and Stehouwer, C. D. (2007): Platelet activation during haemodialysis: comparison of cuprammonium rayon and polysulfone membranes. *Blood Purif.* 25(5-6): 389-94.
- Tigyi, G. and Parrill, A. L. (2003): Molecular mechanisms of lysophosphatidic acid action. *Prog. Lipid Res.* 42(6): 498-526.
- Tigyi, G. (2010): Aiming drug discovery at lysophosphatidic acid targets. *Br. J. Pharmacol.* 161(2): 241-70.
- Tigyi, G., and Miledi, R. (1992): Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. *J. Biol. Chem.* 267(30): 21360-7.
- Tokumura, A. (2002): Physiological and pathophysiological roles of lysophosphatidic acids produced by secretory lysophospholipase D in body fluids. *Biochim. Biophys. Acta* 1582(1-3): 18-25.
- Trinh, C. H., Smith, D. P., Kalverda, A. P., Phillips, S. E., and Radford, S. E. (2002): Crystal structure of monomeric human beta-2-microglobulin reveals clues to its amyloidogenic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99(15): 9771-6.
- Uversky, V. N., and Fink, A. L. (2004): Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim. Biophys. Acta* 1698(2): 131-53.
- Verdone, G., Corazza, A., Viglino, P., Pettirossi, F., Giorgetti, S., Mangione, P., Andreola, A., Stoppini, M., Bellotti, V., and Esposito, G. (2002): The solution structure of human beta2-microglobulin reveals the prodromes of its amyloid transition. *Protein Sci.* 11(3): 487-99.
- Villanueva, J., Hoshino, M., Katou, H., Kardos, J., Hasegawa, K., Naiki, H., and Goto, Y. (2004): Increase in the conformational flexibility of beta 2-microglobulin upon copper binding: a possible role for copper in dialysis-related amyloidosis. *Protein Sci.* 13(3): 797-809.

- Vogt, W. (1957): Pharmacologically active lipidsoluble acids of natural occurrence. *Nature* 179(4554): 300-4.
- Vogt, W. (1957): The chemical nature of Darmstoff. *J. Physiol.* 137(1): 154-67.
- Wang, J., Dickson, D. W., Trojanowski, J. Q., and Lee, V. M. (1999): The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging. *Exp. Neurol.* 158(2): 328-37.
- Yamaguchi, I., Hasegawa, K., Takahashi, N., Gejyo, F., and Naiki, H. (2001): Apolipoprotein E inhibits the depolymerization of beta 2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *Biochemistry* 40(29): 8499-507.
- Yamaguchi, I., Suda, H., Tsuzuike, N., Seto, K., Seki, M., Yamaguchi, Y., Hasegawa, K., Takahashi, N., Yamamoto, S., Gejyo, F., and Naiki, H. (2003): Glycosaminoglycan and proteoglycan inhibit the depolymerization of beta2-microglobulin amyloid fibrils in vitro. *Kidney Int.* 64(3): 1080-8.
- Yamaguchi, K., Naiki, H., and Goto, Y. (2006): Mechanism by which the amyloid-like fibrils of a beta2-microglobulin fragment are induced by fluorine-substituted alcohols. *J. Mol. Biol.* 363(1): 279-88.
- Yamamoto, S., Hasegawa, K., Yamaguchi, I., Tsutsumi, S., Kardos, J., Goto, Y., Gejyo, F., and Naiki, H. (2004): Low concentrations of sodium dodecyl sulfate induce the extension of beta2-microglobulin- related amyloid fibrils at a neutral pH. *Biochemistry* 43(34): 11075-82.
- Yamamoto, S., Yamaguchi, I., Hasegawa, K., Tsutsumi, S., Goto, Y., Gejyo, F., and Naiki, H. (2004): Glycosaminoglycans enhance the trifluoroethanol-induced extension of beta2-microglobulin-related amyloid fibrils at a neutral pH. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15(1): 126-33.
- Yamamoto, S., and Gejyo, F. (2005): Historical background and clinical treatment of dialysis-related amyloidosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1753(1): 4-10.
- Zandomenighi, G., Krebs, M. R., McCammon, M. G., and Fändrich, M. (2004): FTIR reveals structural differences between native beta-sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Sci.* 13(12): 3314-21.
- van Stokkum, I. H., Spoelder, H. J., Bloemendal, M., van Grondelle, R., and Groen, F. C. (1990): Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.* 191(1): 110-8.

van Ypersele de Strihou, C., Floege, J., Jadoul, M., and Koch, K. M. (1994): Amyloidosis and its relationship to different dialysers. *Nephrol. Dial. Transplant.* 9 Suppl 2: 156-61.